

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

AVALIAÇÃO DO CITRATO DE TAMOXIFENO E
TEMPERATURA NA INVERSÃO SEXUAL DA
TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*)

Autor: Marco Antonio Zanoni
Orientador: Prof. Dr. Ricardo Pereira Ribeiro

MARINGÁ
Estado do Paraná
Setembro – 2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

AVALIAÇÃO DO CITRATO DE TAMOXIFENO E
TEMPERATURA NA INVERSÃO SEXUAL DA
TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*)

Autor: Marco Antonio Zanoni
Orientador: Prof. Dr. Ricardo Pereira Ribeiro

Tese apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de DOUTOR EM ZOOTECNIA, no Programa de Pós-graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá - Área de concentração: Produção Animal.

MARINGÁ
Estado do Paraná
Setembro – 2011

"Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)"
(Biblioteca Setorial - UEM. Nupelia, Maringá, PR, Brasil)

Z33a Zanoni, Marco Antônio, 1963-
Avaliação do citrato de tamoxifeno e temperatura na inversão sexual da tilápia do Nilo
(*Oreochromis niloticus*) / Marco Antônio Zanoni. -- Maringá, 2011.
63 f. : il.

Tese (doutorado em Zootecnia)--Universidade Estadual de Maringá, Dep. de Zootecnia,
2011.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Pereira Ribeiro.

1. *Oreochromis niloticus* (Pisces, Cichlidae) "tilápia do Nilo" - Reprodução - Inversão
sexual. I. Universidade Estadual de Maringá. Departamento de Zootecnia. Programa de Pós-
graduação em Zootecnia.

CDD 22. ed. – 639.37741562
NBR/CIP - 12899 AACR/2



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**AVALIAÇÃO DO CITRATO DE TAMOXIFENO E
TEMPERATURA NA INVERSÃO SEXUAL DA
TILÁPIA DO NILO (*Oreochromis niloticus*)**

Autor: Marco Antonio Zanoni

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Pereira Ribeiro

TITULAÇÃO: Doutor em Zootecnia - Área de Concentração Produção
Animal

APROVADA em 30 de setembro de 2011.

Prof. Dr. Lauro Daniel
Vargas Mendez

Prof. Dr. Heitor Frossard

Prof. Dr. Júlio Hermann
Leonhardt

Prof. Dr. Erico Sengik

Prof. Dr. Ricardo Pereira Ribeiro
(Orientador)

“Há duas consequências possíveis:
se o resultado confirmar a hipótese,
então você tem uma medição.
Se o resultado for o contrário à hipótese,
então você fez uma descoberta”.

Enrico Fermi

Dedico esta Tese

à minha esposa, Everlin,
aos meus filhos, Henrique e Arthur,
e aos meus pais, Aristides e Beatriz,
por todo carinho, apoio e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Nesta página muito especial deste trabalho, gostaria de agradecer a algumas pessoas, dentre as muitas que me ajudaram a realizá-lo.

Ao Professor Doutor Ricardo Pereira Ribeiro, pela amizade, orientação e incentivo durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Professor Doutor Carlos Antonio Lopes de Oliveira, pela amizade e pelo auxílio nas análises estatísticas, as quais foram de grande valia.

A Professora Doutora Célia Guadalupe Tardeli de Jesus Andrade, da Microscopia Eletrônica da Universidade Estadual de Londrina, pela solidariedade e amizade.

Ao amigo Fabiano Gonçalves Costa, docente na Universidade Estadual do Norte do Paraná, pela amizade e ajuda imprescindível.

A amiga Priscila Carozza Frasson Costa, docente na Universidade Estadual do Norte do Paraná, pelas palavras de incentivo e amizade.

Ao grande amigo e companheiro de pescarias Mauro Caetano Filho, Biólogo e Coordenador da Estação de Piscicultura da Universidade Estadual de Londrina.

A amiga Melanie Digmayer, sempre prestativa e que colaborou inúmeras vezes providenciando materiais e reagentes.

As minhas estagiárias Thais Vasconcellos Leal e Aline Nazareno, pelo bom trabalho e pelas horas de dedicação.

Aos funcionários Waldemar e Jurandir, da Estação de Piscicultura da Universidade Estadual de Londrina, pela contribuição imprescindível na realização dos experimentos.

Aos familiares Everlin, Henrique e Arthur, pelo apoio e carinho durante a jornada.

Aos demais Professores do Programa de Pós-graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá que participaram efetivamente na minha formação.

BIOGRAFIA

MARCO ANTONIO ZANONI, filho de Aristides Zanoni e de Beatriz Damasio Zanoni, nascido na cidade de Ibitiporã, no Estado do Paraná, no dia 27 de novembro de 1963.

Em 1993, recebeu o título de Bacharel em Ciências Biológicas, pela Universidade Estadual de Londrina - UEL.

Em abril de 1994, iniciou o Mestrado em Aquicultura, área de concentração: Piscicultura Interior, na Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, concluído no ano de 1997.

Atuou como prestador de serviços e como bolsista do programa RHAE-CNPq nos anos de 1997 e 1998 na Universidade Estadual de Londrina.

No período de 1998 a 2001 prestou serviços como Técnico, na propriedade do Sr. Jabur Abdla.

Em 2002, iniciou carreira de docente na Universidade Estadual do Norte do Paraná - UENP, onde atua até hoje.

Em março de 2008, ingressou no Programa de Pós-graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá - UEM em nível de Doutorado - área de concentração: Produção Animal.

Em 30 de outubro de 2011, submeteu-se à defesa da tese para obtenção do título de Doutor em Zootecnia, no Programa de Pós-graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE FIGURAS	ix
RESUMO	xi
ABSTRACT	xiii
I – INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1 A TILÁPIA E SUAS CARACTERÍSTICAS	1
1.2 CONTROLE REPRODUTIVO DA TILÁPIA	1
1.2.1 Sexagem manual	2
1.2.2 Manipulação cromossômica	2
1.2.2.1 Hibridação interespecífica	2
1.2.2.2 Alteração do número de cromossomos	3
1.2.2.3 Supermachos	4
1.2.3 Inversão sexual	4
1.2.3.1 Fatores exógenos que influenciam a inversão sexual	5
1.2.3.2 Fatores endógenos que influenciam a inversão sexual	6
1.2.4 Inversão sexual utilizando hormônio esteroides 17α -metiltestosterona	7
1.2.5 Inversão sexual por desreguladores endócrinos	8
1.2.5.1 Ecotoxicidade do tamoxifeno	9
REFERÊNCIAS	11
II – OBJETIVOS GERAIS	20
III – AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DO CITRATO DE TAMOXIFENO, NA INVERSÃO SEXUAL DE TILÁPIA DO NILO (<i>Oreochromis niloticus</i>)	21
Resumo	21
Abstract	21
Introdução	22

Material e métodos	24
Resultados e discussão	26
Conclusão	30
Referências	30
IV – EFEITO DE DIFERENTES TEMPERATURAS NA INVERSÃO SEXUAL DE TILÁPIAS DO NILO (<i>Oreochromis niloticus</i>)	34
Resumo	34
Abstract	34
Introdução	35
Material e métodos	36
Resultados e discussão	38
Conclusão	43
Referências	43
V – UTILIZAÇÃO DE DIFERENTES TÉCNICAS: CITOLÓGICA, ESTRUTURAL E ULTRAESTRUTURAL NA DESCRIÇÃO DE GÔNADAS DE TILÁPIA DO NILO (<i>Oreochromis niloticus</i>)	47
Resumo	47
Abstract	47
Introdução	48
Material e métodos	49
Resultados	50
Discussão	56
Conclusão	59
Referências	60

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

		Página
III – Avaliação da eficiência do citrato de tamoxifeno, na inversão sexual de tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>)		
Figura 1	Curva de ganho em peso de larvas de tilápia do Nilo variedade Supreme, submetidas a tratamentos com dietas contendo diferentes quantidades de citrato de tamoxifeno (0, 25, 50, 75 e 100 mg kg ⁻¹ de ração), por um período de 28 dias	26
Figura 2	Curva e reta de regressão do número de gônadas pares observadas em alevinos de tilápia do Nilo submetidas a dietas contendo diferentes quantidades de citrato de tamoxifeno na dieta	28
Figura 3	Micrografias de gônadas de tilápia do Nilo, coradas com hematoxilina-eosina e observadas em aumento de 40 vezes, submetidas a diferentes dietas contendo citrato de tamoxifeno. Os ovários apresentam ovócitos normais em diferentes estádios de maturação	29
IV – Efeito de diferentes temperaturas na inversão sexual de tilápias do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>)		
Figura 1	Curva de ganho em peso das larvas de tilápias do Nilo mantidas em diferentes temperaturas: 28, 30, 32 e 34°C alimentadas com ração contendo 60 mg kg ⁻¹ de 17 α -metiltestosterona, por um período de 28 dias	39
Figura 2	Reta e equação da regressão linear da inversão sexual de alevinos de tilápia do Nilo induzidos por diferentes temperaturas	40
Figura 3	Radiografias de alevinos de tilápia submetidos aos diferentes tratamentos nas temperaturas 28, 30, 32 e 34°C e do controle (28B)	42

V – Utilização de diferentes técnicas: citológica, estrutural e ultraestrutural na descrição de gônadas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)

Figura 1	Fotomicrografia de ovário de tilápia do Nilo coradas com acetato carmim, é possível reconhecer os ovócitos com núcleos evidentes (seta) e seus limites celulares (cabeça de seta)	51
Figura 2	Fotomicrografia de gônadas masculinas em fase inicial de desenvolvimento testicular e com a presença de gônias (seta)	51
Figura 3	Fotomicrografia de cortes histológicos do órgão masculino corado com HE - presente a espermatogônia com citoplasma com pouca afinidade pelo corante HE (seta). A cabeça da seta indica um túbulo seminífero em fase inicial de desenvolvimento	52
Figura 4	Fotomicrografia de cortes histológicos do órgão masculino corado com HE, as setas largas apontam para a cápsula de tecido conjuntivo e o círculo branco destaca um cisto espermático repleto de espermatogônias. A cabeça de seta indica uma célula de Sertoli envolvendo células germinativas do cisto em destaque	52
Figura 5	Corte histológico de gônadas femininas de <i>Oreochromis niloticus</i> , coradas pelo método de HE - presente as várias ovogônias em diferentes estádios de maturação. O asterisco destaca a presença de citoplasma basófilo presente no interior da ovogônia	53
Figura 6	Corte histológico de gônadas femininas de <i>Oreochromis niloticus</i> , corada pelo método de HE a seta fina aponta o núcleo de uma gônia e a cabeça de seta um dos nucléolos presentes no núcleo	53
Figura 7	Eletronmicrografias de uma gônada inteira de tilápia do Nilo, que se apresenta enovelada, após a obtenção do ponto crítico	54
Figura 8	Eletronmicrografias do epitélio de revestimento de gônadas de tilápia do Nilo	54
Figura 9	Eletronmicrografias de gônadas masculinas de tilápia do Nilo presente a rede frouxa de fibras de colágeno e presença de células germinativas (setas brancas)	55
Figura 10	Eletronmicrografias de gônadas femininas de tilápia do Nilo, a seta branca aponta para uma rede densa de fibras de colágeno	55
Figura 11	Eletronmicrografias de gônadas femininas de tilápia do Nilo, as setas brancas apontam para ovócito em diferentes estádios de maturação	55

RESUMO

A aquicultura no Brasil vem se aprimorando e buscando novas técnicas para melhorar a qualidade do pescado produzido, mas um dos principais problemas é a utilização de esteroides na inversão sexual da tilápia, apesar de ser uma técnica difundida e praticada em várias regiões do mundo; é crescente a preocupação com um passivo ambiental gerado pela utilização da 17 α -metiltestosterona. Nesse contexto, esse trabalho teve como objetivo geral avaliar a utilização de não-esteroides na inversão sexual de tilápia do Nilo. O primeiro experimento foi realizado para avaliar a influência do citrato de tamoxifeno na inversão sexual de larvas de tilápia a partir dos dois dias de vida, que foram distribuídas em um delineamento experimental de cinco tratamentos e três repetições, recebendo dietas com diferentes quantidades de citrato de tamoxifeno: 0, 25, 50, 75 e 100 mg kg⁻¹ de ração. Após 28 dias de tratamento, as larvas restantes em cada tratamento foram contadas e transferidas para caixas de água de 500 L onde receberam dieta contendo 28% de proteína bruta por 60 dias. Após este período, os alevinos foram sexados pelo método “squash”. A sobrevivência $75,5 \pm 5,74$; $73 \pm 4,76$; $66 \pm 11,19$; $76,5 \pm 4,12$; $75 \pm 3,46\%$ e a porcentagem média de indivíduos machos $62,5 \pm 5$; $70 \pm 8,1$; $60 \pm 8,2$; $70 \pm 0,0$; $62,5 \pm 9,5\%$ para os tratamentos 0, 25, 50, 75 e 100 mg de citrato tamoxifeno kg⁻¹ de ração, respectivamente, não apresentaram diferenças estatísticas significativas. O número de gônadas presentes em cada indivíduo apresentou redução significativa, nos tratamentos com 75 e 100 mg de tamoxifeno ($89,3 \pm 0,527$ e $79,3 \pm 0,378\%$) quando comparado com os tratamentos 0, 25 e 50 mg de tamoxifeno ($98,9 \pm 1,0$; $97,6 \pm 1,0$ e $94,5 \pm 1,0\%$, respectivamente), a estrutura histológica das gônadas femininas não apresentou diferenças e os ovários em todos os tratamentos apresentaram ovócitos bem definidos e em vários estádios de maturação. O segundo experimento avaliou os efeitos da temperatura 28, 30, 32 e 34°C e do controle (28°C + ração acrescida de 60 mg de 17 α -metiltestosterona) na inversão sexual, sobrevivência e presença de deformidades na tilápia do Nilo. Os resultados demonstraram diferença

estatística entre a proporção de machos, sendo que a temperatura de 32 e 34°C e controle ($91 \pm 0,71$; $96 \pm 0,59$ e $98,33 \pm 1,0\%$, respectivamente) apresentaram resultados superiores aos obtidos para os tratamentos 28 e 30°C ($71 \pm 0,29$ e $82 \pm 0,33\%$). A sobrevivência: $90,49 \pm 2,32$; $88,20 \pm 2,04$; $85,43 \pm 1,58$; $82,16 \pm 1,63$ e $90,74 \pm 2,28\%$ para as temperaturas 28, 30, 32 e 34°C e controle com hormônio, respectivamente, não apresentou diferenças estatísticas, mas houve diferenças na sobrevivência entre o controle e os tratamentos 32 e 34°C. Na análise das radiografias não foi possível observar presença de alterações morfológicas nos peixes submetidos aos diferentes tratamentos. Com esse experimento concluiu-se que as temperaturas de 32 e 34°C foram capazes de masculinizar larvas geneticamente fêmeas, e que não houve incremento na mortalidade e na presença de deformidades que possam ser atribuídas aos tratamentos. Essa técnica é uma alternativa para a utilização de hormônios esteroides. O terceiro experimento foi realizado com o objetivo de descrever as gônadas de alevinos de tilápia do Nilo (Supreme) com 75 dias de idade, utilizando técnicas citológicas, estruturais e ultraestruturais como ferramenta. Na técnica citológica, as gônadas coradas com acetato carmim foram prensadas entre lâmina e lamínula e observadas em microscopia de luz. Para a preparação estrutural, as gônadas após processamento foram cortadas em micrótomo na espessura de 5 μm , coradas com hematoxilina-eosina e observadas em microscopia de luz. No método ultraestruturais, as gônadas foram fotodocumentadas em microscópio eletrônico de varredura FEI QUANTA 200. As preparações citológicas e estruturais dos ovários permitiram a visualização de ovócitos, seus limites celulares, os núcleos e nucléolos associados. Nos machos, a preparação citológica não permitiu a identificação clara das estruturas, mas na preparação estrutural dos testículos foi possível visualizar cistos espermáticos, células de sertoli e o início da formação de túbulos seminíferos. A microscopia eletrônica de varredura, utilizada para a visualização de superfície, permitiu após a fratura das gônadas, observar estrutura internas, tais como espermatogônias, ovócitos e fibras de colágeno. Os resultados obtidos demonstraram que as três técnicas foram eficientes na distinção do sexo do indivíduo, permitindo a observação e a comparação das estruturas presentes nas gônadas.

Palavras-chave: receptor de estrógeno, disruptores endócrinos, monossexo, gônadas, microscopia eletrônica, microscopia de luz.

ABSTRACT

Aquaculture in Brazil has been improving and finding new techniques to improve the quality of fish produced, one of the main problems is the use of steroids in sex inversion of tilapia, despite being a widespread technique and practiced in various regions of the world is increasing concern to environmental liabilities generated by the use of 17 α -methyltestosterone. In this context, this study aims to evaluate the overall use of non steroids in sex inversion of Nile tilapia. The first experiment was conducted to evaluate the influence of citrate tamoxifen on sex inversion of Nile tilapia larvae from two days of life, they were divided into an experimental design of five treatments and three replicates, and fed diets with different amounts of citrate tamoxifen: 0, 25, 50, 75 and 100 mg kg⁻¹ of feed. After 28 days of treatment, the larvae remaining in each treatment were counted and transferred to water tanks of 500 liters which were fed a diet containing 28% crude protein for 60 days. After this period the fry were sexed by the "squash" method. The survival 75.5 ± 5.74 , 73 ± 4.76 , 66 ± 11.19 , 76.5 ± 4.12 , 75 ± 3.46 and average percentage of male individuals 62.5 ± 5 , 70 ± 8.1 , 60 ± 8.2 , 70 ± 0.0 , 62.5 ± 9.5 for treatments 0, 25, 50, 75 and 100 mg of citrate tamoxifen kg⁻¹ diet, respectively, showed no statistically significant differences. The number of gonads in each subject experienced a significant reduction in the treatments with 75 and 100 mg of citrate tamoxifen (89.3 and $79.3 \pm 0.527 \pm 0.378$) when compared with treatments 0, 25 and 50 mg of citrate tamoxifen ($98, 9 \pm 1.0$, 97.6 ± 1.0 and 94.5 ± 1.0 , respectively), the histological structure of female gonads did not differ and ovaries in all treatments showed well-defined and oocytes at various stages of maturation. The second experiment evaluated the effects of temperature 28, 30, 32 and 34°C and control (28°C + ration plus 60 mg of 17 α -methyltestosterone) in sexual inversion, survival and presence of deformities in Nile tilapia. The results showed a statistical difference between the proportion of males, with a temperature of 32 and 34°C and control (91 ± 0.71 ; 96 ± 0.59 and $98.33 \pm 1.0\%$, respectively) showed better results than those

obtained for 28 and 30 degrees treatments (71 and $82 \pm 0.29 \pm 0.33\%$). Survival: 90.49 ± 2.32 , 88.20 ± 2.04 , 85.43 ± 1.58 , 82.16 ± 1.63 and $90.74 \pm 2.28\%$ for temperatures 28, 30, 32 and 34°C, respectively, showed no statistical differences, but there were differences in survival between the control and treatments 32 and 34°C. In the analysis of radiographs was not possible to observe the presence of morphological changes in fish subjected to different treatments. With this experiment it was concluded that temperatures of 32 and 34°C larvae were able to genetically masculinizing females, and that there was no increase in mortality and in deformities presence that can be attributed to treatment. This technique is an alternative to the use of steroid hormones. The third experiment was conducted in order to describe gonads of Nile tilapia fingerlings (Supreme) with 75 days of age, using as a tool cytological techniques, structural and ultrastructural. Cytological technique gonads were stained with carmine acetate pressed between slide and coverslip and observed under light microscopy. To structural prepare gonads, after processing, were cut in microtome at thickness of 5 mm, stained with hematoxylin-eosin and observed under light microscopy. At the ultrastructural method, gonads were photo documented in a scanning electron microscope FEI QUANTA 200. The structural and cytological preparations allowed the visualization of the ovaries of oocytes, cell boundaries, nuclei and nucleoli associated. In males the cytologic preparations did not allow a clear identification of the structures, but in preparing structural testicular sperm was possible to visualize cysts, Sertoli cells and the beginning of the formation of seminiferous tubules. The scanning electron microscopy, used to visualize surface allowed, after the fracture of the gonads, to observe internal structure, such as spermatogonia, oocytes and collagen fibers. The results showed that all three techniques were efficient in distinguishing the sex of the individual, allowing observation and comparison of the structures present in the gonads.

Keywords: estrogen receptor, endocrine disruptores, monosex, gonads, electron microscopy, light microscopy.

I – INTRODUÇÃO GERAL

1.1 A TILÁPIA E SUAS CARACTERÍSTICAS

Embora cerca de 70 espécies de ciclídeos recebam a denominação de tilápia, somente *Oreochromis niloticus*, *O. mossabicus*, *O. aureus*, *Tilapia rendali* e seus híbridos apresentam importância para a aquicultura mundial (STICKENY, 1997). Sendo que a tilápia do Nilo (*O. niloticus*) está entre os sete mais importantes peixes tropicais produzidos pela aquicultura (FAO, 2009).

A produção da aquicultura brasileira para o ano de 2009, de peixes de águas continentais segundo Lopeira-Barrero et al. (2011), foi de 337.353 toneladas, sendo que desse montante a família Cichlidae, com destaque para a tilápia do Nilo variedade chitralada, contribuiu com 132.957 toneladas, representando 39,5% da produção total de peixes.

A produtividade crescente das tilápias explica-se pela qualidade que esse peixe exibe e que elevam seu potencial para a piscicultura, tais como alimentar-se dos itens básicos da cadeia trófica e aceitar grande variedade de alimentos; responder com a mesma eficiência à ingestão de proteínas de origem vegetal e animal; e apresentar resposta positiva à fertilização dos viveiros (SIPAÚBA-TAVARES, 1995). A estas características soma-se ainda a rusticidade e resistência a doenças, ao superpovoamento e a baixos teores de oxigênio dissolvido; e finalmente a disponibilidade de alevinos durante todo o ano nas regiões mais quentes do país (BOSCOLO et al., 2001).

1.2 CONTROLE REPRODUTIVO DA TILÁPIA

O controle reprodutivo é de fundamental importância para o cultivo racional da tilápia do Nilo, evitando assim problemas provenientes dos gastos energéticos com a cópula e desova, excesso populacional nos viveiros, além de que nesta espécie, o macho

apresenta maior crescimento que a fêmea (MEURER et al., 2005; NEUMANN et al., 2009). As técnicas mais estudadas e empregadas para controle reprodutivo são a sexagem manual (DUNHAM, 1990); manipulação cromossômica (WOLFARTH; HULATA, 1981; THORGAARD, 1983; DIAZ; MALDONADO, 1994) e inversão sexual (DESPREZ et al., 2003; DESPREZ et al., 2006).

1.2.1 Sexagem manual

A presença de gônadas masculinas ou femininas em peixes não é uma característica de fácil observação e muitas vezes pode levar a erros na determinação sexual de peixes. A presença de diferenças morfológicas entre machos e fêmeas, que podem ser classificadas como temporárias ou permanentes, podem ser utilizadas para a sexagem. As tilápias apresentam dimorfismo sexual secundário permanente, representado principalmente pela papila urogenital distinta entre os sexos (BORGES, 2002), o que facilita a separação entre machos e fêmeas. As principais desvantagens deste método são: a sexagem é feita em juvenis com idade entre 60 e 90 dias, o que demanda maior espaço físico e uso de insumos; falta de mão de obra treinada; grande demanda de tempo para a seleção; mortalidade após o manejo; descarte das fêmeas; margem de erro considerável, principalmente quando a sexagem é feita com alevinos pouco desenvolvidos ou por pessoas sem muita experiência, alcançando percentuais de machos inferiores a 90% (KUBITZA, 2000; BEARDMORE et al., 2001).

1.2.2 Manipulação cromossômica

Vários são os processos de manipulação cromossômica com potencial para alterar a proporção entre machos e fêmeas.

1.2.2.1 Hibridação interespecífica

Esse processo é realizado a partir do cruzamento entre casais formados por espécies diferentes, com o objetivo de se obter populações em que, aproximadamente, 90 % ou mais são machos híbridos. A existência de pelo menos dois sistemas cromossômicos de determinação de sexo nas espécies de tilápia permitiu o desenvolvimento da tecnologia da hibridização. Na tilápia do Nilo (*O. niloticus*) e na

tilápia de Moçambique (*O. mossambicus*), o sexo é determinado por cromossomos X e Y. As fêmeas são homogaméticas XX e os machos heterogaméticos XY. Na tilápia azul (*O. aureus*) e na tilápia de Zanzibar (*O. hornorum*), os machos ZZ são homogaméticos e as fêmeas ZW são heterogaméticas (WOLFARTH, 1994).

O cruzamento de indivíduos fêmea XX (*O. niloticus*) com indivíduos macho ZZ (*O. hornorum* ou *O. aureus*) propiciou avanço na tilapicultura. A progênie formada apresenta a combinação de cromossomos sexuais ZX, que resulta em fenótipo macho. Infelizmente, a produção de progênie 100% macho por meio desta técnica não é sempre possível. A dificuldade de manutenção de estoques de reprodutores puros, principalmente em condições de campo, conjugada com a possível existência de genes autossômicos epistáticos envolvidos na determinação sexual, além da influência de fatores ambientais, devem ser as principais causas da ocorrência de progênies com ambos os sexos (BEARDMORE et al., 2001). Kubitzka (2000) e Phelps e Popma (2000), ainda, relatam que a incompatibilidade comportamental dos reprodutores durante o acasalamento e a necessidade de mão de obra especializada fazem com que essa técnica não seja muito utilizada.

1.2.2.2 Alteração do número de cromossomos

A manipulação dos conjuntos cromossômicos em peixes é praticável pela facilidade com que os gametas desses animais podem ser manipulados e fertilizados artificialmente (OLIVEIRA, 1999). A produção de populações monossexo é possível com a esterilização de macho e fêmeas, que cultivados juntos não desperdiçariam energia para a reprodução. Essa esterilização pode ser alcançada por meio de técnicas de manipulação cromossômica, formando-se indivíduos poliploides que são aqueles que possuem um número de cromossomos múltiplos de seu conjunto de base haploide. Segundo Hulata (2001), a produção de poliploides vem sendo descrita em várias espécies de salmonídeos, carpas, tilápias, pacus e tambaquis, com bons resultados em relação à taxa de poliploidia e sobrevivência. Outra maneira de manipulação cromossômica é aquela em que os descendentes se desenvolvem a partir de um só progenitor, ou seja, da mãe (ginogenética) ou pai (androgenético) (CHOURROUT, 1982, 1984; GRAHAM, 1983; YAMAZAKI, 1983; THORGAARD, 1986; LÓPEZ; TORO, 1990; CHAPARRO, 1994).

1.2.2.3 Supermachos

Com base na hipótese de determinação sexual monofatorial, vários autores propuseram um programa de melhoramento genético, no qual machos com cromossomos sexuais YY obtidos por manipulação genética de espécies como a *O. mossambicus* (YANG et al., 1980; VARADARAJ; PANDIAN, 1989) e *O. niloticus* (BAROILLER; JALABERT, 1989) seriam cruzados com fêmeas normais XX. O resultado desse cruzamento é a obtenção de descendentes 100% machos (BALDISSEROTTO, 2002). Toguyeni et al. (2002) afirmaram que machos com genótipo XY devem ser utilizados na produção comercial, por apresentarem melhores desempenhos de crescimento do que o genótipo YY.

A vantagem da utilização de supermachos de tilápia para a produção em grande escala de populações monossexo, segundo Beardmore et al. (2001), e que essa técnica não utiliza hormônios esteroides, e portanto, considerada ambientalmente amigável quando comparada a outras técnicas como a hibridização e a inversão sexual. Outra vantagem é que os machos produzidos para cultivo são geneticamente normais. Os mesmos autores afirmam também que embora o processo seja demorado e trabalhoso, uma vez desenvolvida a técnica de produção de machos monossexo, ela pode ser mantida pela feminilização eventual de indivíduos genótipos YY. Desde que a pureza dos reprodutores possa ser mantida, a tecnologia pode ser aplicada em sistemas de incubação existentes, sem instalações especiais ou exigências do trabalho, e que descontando os custos iniciais de desenvolvimento, os custos adicionais para a aplicação desta tecnologia pelo produtor é mínimo, propiciando vantagens econômicas.

1.2.3 Inversão sexual

A diferenciação sexual em vertebrados inferiores, incluindo peixes é um processo muito instável e, em muitos casos, alto grau de plasticidade fenotípica do sexo persiste ao longo da vida inteira (BLAZQUEZ et al., 1998). A determinação do sexo em peixes está principalmente sob controle genético, mas também pode ser influenciada por fatores ambientais. Os peixes, durante sua fase de larva, possuem gônadas especialmene suceptíveis à ação de fatores indutores de diferenciação sexual exógenos e endógenos.

1.2.3.1 Fatores exógenos que influenciam a inversão sexual

Pela instabilidade da diferenciação, influências exógenas relacionadas ao ambiente, podem alterar a diferenciação sexual em inúmeras espécies de peixes (BAROILLER et al., 1995; PAVLIDIS et al., 2000). Vários fatores ambientais são descritos como tendo influência sobre a proporção sexual de peixes, entre eles a temperatura (CONOVER; KYNARD, 1981; CONOVER, 1984) o pH (RUBIN, 1985; RÖMER; BEISENHERZ, 1996), densidade de estocagem (OLIVIER; KAISER, 1997), poluição (ANDERSSON et al., 1999; HARRIES et al., 1999), e a supressão da concorrência reprodutiva, provavelmente por meio de mecanismos de feedback sobre as vias neuroendócrinas (BAROILLER et al., 1999) e outras condições sociais (TOGUYENI et al., 1997).

Os casos da influência da temperatura sobre a proporção entre os sexos são numerosos e amplamente relatados. Mair et al. (1990) observaram que houve maior proporção de machos (89%) quando larvas de *O. mossambicus* foram mantidas a 19°C que a 28°C (0%). Em outro experimento, os autores observaram que houve excesso de fêmeas (80%) quando *O. Aureus* foi mantida em temperatura de 32°C, enquanto que a proporção sexual de fêmeas no controle a 29°C foi de 97%. Em um estudo realizado por Baroiller et al. (1995), com *O. niloticus* proveniente de cruzamento de fêmeas XX com machos XX invertido mantidos em temperaturas elevadas, a proporção de machos no grupo tratado a 36°C teve um incremento entre 14,1 e 91%, em comparação com o controle criados a 28°C. Já Mbahinzireki e Dabrowski (1997) realizaram um experimento com larvas *O. niloticus* criadas à temperatura de $35 \pm 1^\circ\text{C}$ por um período de 60 dias, e obtiveram 80% de indivíduos do sexo masculino, enquanto que o controle mantido a $22 \pm 1^\circ\text{C}$ a proporção foi de 1:1.

A exposição em longo prazo da tilápia do Nilo à alta temperatura durante um tratamento masculinizante pode diminuir a sobrevivência, e diminuir o seu crescimento de forma substancial, sendo que temperaturas iguais ou acima de 37 a 38°C estão próximas às consideradas letais para a tilápia do Nilo e tilápia azul. Além disso, essa temperatura elevada no início do desenvolvimento pode gerar problemas de aclimação quando os alevinos forem transferidos para ambientes com temperatura em torno de 27-28°C (BARRAS, 2000).

1.2.3.2 Fatores endógenos que influenciam a inversão sexual

Os indutores endógenos naturais das gônadas dos peixes são os esteroides sexuais. Os estrogênios atuam como indutores feminino e os andrógenos funcionam como indutores masculino. Evidências sobre a função dos hormônios esteroides sexuais na diferenciação sexual de peixes vem se acumulando, sendo que vários autores relataram terem tido sucesso na inversão sexual de peixes usando esteroides (HUNTER; DONALDSON, 1983; PANDIAN; SHEELA, 1995; NAKAMURA et al., 1998; BAROILLER et al., 1999; GUIGUEN et al., 1999).

Diferentes andrógenos, estrógenos, ou precursores de esteroides, administrado por imersão ou na dieta em vários estágios de desenvolvimento dos peixes, podem influenciar o processo de definição gonadal (DEVLIN; NAGAHAMA, 2002). Phelps e Popma (2000) afirmaram que 60 mg kg⁻¹ de ração, de 17 α -metiltestosterona na dieta por períodos de 21 a 28 dias é capaz de induzir a inversão sexual de larvas de tilápia do Nilo para machos em 80 a 100%. Os autores ainda propõem que para obter sucesso no processo de inversão, as larvas não devem exceder a 14,0 mm de comprimento inicial, a densidade deve ser de 3.000 a 5.000 indivíduos m⁻³, e o alimento contendo o hormônio deve ser de boa qualidade nutricional e palatabilidade para favorecer a ingestão.

O equilíbrio hormonal entre os estrógenos e andrógenos é crucial no processo de formação e diferenciação gonadal dos peixes (teleósteos). Este equilíbrio depende da disponibilidade e atividade das enzimas de síntese de esteroides, e em particular sobre o complexo aromatase citocromo P450 (P450arom), que é capaz de converter, nas células da granulosa do ovário, a testosterona para 17 β -estradiol (DEVLIN; NAGAHAMA, 2002).

A inibição da enzima P450arom durante as fase larval de desenvolvimento de peixes gonocóricos leva à diferenciação sexual de fêmeas geneticamente defenidas para machos fenotípicos (PIFERRER et al., 1993; KITANO et al., 2000; KROON; LILEY, 2000; KWON et al., 2000; AFONSO et al., 2001; KOBAYASHI et al., 2003), no salmão (PIFERRER et al., 1994), linguado japonês (KITANO et al., 2000), e zebra fish (FENSKE; SEGNER, 2004; UCHIDA et al., 2004), sugerindo que o estrógeno endógeno desempenha papel importante no desenvolvimento natural do ovário. A feminilização de machos genéticos induzida por estrógeno foi comprovada em tilápias *Oreochromis mossambicus* por Nakamura e Takahashi (1974) e *O. niloticus* por Kobayashi et al. (2003).

O momento em que o processo de diferenciação e desenvolvimento das gônadas inicia a biossíntese de hormônios esteroides é ainda desconhecida, já que nessa fase inicial as gônadas ainda estão demasiado pequenas para se detectar quimicamente a presença de esteroides. Em geral, hormônios sexuais são produzidos por dois tipos especiais de células: a) as células produtoras de esteroides (CPE) localizadas nas camadas da teca em torno de oócitos no ovário, e b) células de Leydig nos interstícios entre os cistos de células germinativas espermatogênica do testículo (NAKAMURA, 2003).

Observações recentes utilizando fêmeas e machos de tilápia geneticamente controlados mostraram que as CPEs são capazes de diferenciar a área ao redor dos vasos sanguíneos nas gônadas indiferenciadas em ovários, mas não em testículos. Esta pesquisa mostrou que as CPEs aparecem inicialmente na época da diferenciação sexual. Em contrapartida, as enzimas da esteroidogênese não se expressam durante a diferenciação testicular em tilápias sugerindo que os hormônios esteroides, incluindo andrógenos, não têm papel importante na diferenciação testicular natural. Essa hipótese é contrariada ao se utilizar andrógenos exógenos para inverter sexualmente fêmeas genéticas para machos fenotípicos (NAKAMURA et al., 2003).

1.2.4 Inversão sexual utilizando hormônio esteroide 17 α -metiltestosterona

A eficácia desse processo depende de fatores ambientais, do hormônio, sua concentração e do momento em que o procedimento está sendo utilizado (DEVLIN; NAGAHAMA, 2002). Entre os hormônios pesquisados, o andrógeno sintético 17 α -metiltestosterona, administrado por via oral, é hoje o método mais utilizado em criações comerciais, sendo que esse andrógeno tem sido bastante empregado no processo de inversão sexual, por apresentar vantagens tais como: pode ser aplicado em grande escala; a reprodução de tilápias em tanques é minimizada ou eliminada; as fêmeas não são desprezadas, como ocorre durante a sexagem manual; o cultivo de populações só de macho possibilita maior produtividade pelo melhor crescimento dos machos; e o método não é muito trabalhoso ou oneroso (ROTHBARD et al., 1990; POPMA; GREEN, 1990; CURTIS et al., 1991; MAINARDES-PINTO et al., 2000; BOMBARDELLI et al., 2007; ZANARDI et al., 2011).

Entre as desvantagens da utilização do 17 α -metiltestosterona estão os resíduos dos esteroides administrados são carcinogênicos e podem afetar os consumidores;

estresse gerado durante a inversão pode reduzir a sobrevivência; a reversão sexual pode retardar a maturidade sexual e reduzir a fecundidade dos peixes; altas dosagens podem levar à esterilidade, reversão sexual paradoxal e supressão do crescimento (PANDIAN; SHEELA, 1995).

Apesar de ter sido demonstrado em estudos específicos que a utilização do hormônio não resulta no acúmulo de resíduos nos tecidos dos peixes tratados, ainda há preocupações quanto à sua liberação no ambiente e à reação dos consumidores (BEARDMORE et al., 2001; KARAYÜCEL et al., 2003; ZANARDI, et al., 2011). Essas preocupações têm feito com que se busque a melhor qualidade e eficiência no processo, com a diminuição dos custos e riscos e, principalmente, com redução de impactos ambientais (PANDIAN; SHEELA, 1995; BARAS et al., 2000).

1.2.5 Inversão sexual por desreguladores endócrinos

Os mecanismos dos efeitos de desregulação endócrina foram classificados por Sonnenschein e Soto (1998) em os que imitam os efeitos dos hormônios endógenos, tais como estrógenos e andrógenos; antagonizam os efeitos normais dos hormônios endógenos; alterando o padrão de síntese e metabolismo de hormônios naturais; e que altera receptor de hormônio. Atualmente, a atenção tem sido focada em compostos que exercem seus efeitos pela interação com o receptor estrogênio (RE) e, assim, são estrógeno-ativo.

A ação do estrógeno é mediada por pelo menos dois tipos de receptores, o RE α e o RE β , que são membros da família de receptores nucleares. A ligação ativa do RE ao estrogênio regula a expressão de genes diretamente pela vinculação a um cis-elemento denominado elemento estrogênio responsivo ou indiretamente pela interação com outros fatores de transcrição implicados em casos específicos de vias transcricional (MATTHEWS; GUSTAFSSON, 2003).

A existência, em peixes teleósteos, dos dois subtipos de RE (α e β) foi confirmada em algumas espécies tais como a tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus* (CHANG et al., 1999), dourada, *Sparus aurata* (SOCORRO et al., 2000.), bagre do canal, *Ictalurus punctatus* (XIA et al., 1999, 2000), e no linguado Japonês, *Paralichthys olivaceus* (KITANO et al., 2006). Além disso, duas formas de RE β foram encontradas na corvina do Atlântico *Micropogonias ondula* (HAWKINS et al., 2000) e no peixe-

zebra, *Danio rerio* (MENUET et al., 2002). No entanto, segundo Kitano et al. (2007), o papel dos receptores de estrógeno em peixes teleósteos continua por ser esclarecida.

O tamoxifeno é um composto derivado do trifeniletileno, amplamente utilizado no tratamento de câncer de mama primário e recorrente (CARLSON, 1997), e desde a sua aprovação pela *Food and Drug Administration* (USA) em 1977, tornou-se o antiestrógeno preferido para tratamento para mulheres pós-menopausa (BRYSON; PLOSKER, 1993), é facilmente absorvido via oral, atingindo níveis plasmáticos máximos 4 a 7h após a ingestão. Este fármaco que possui solubilidade de 0,01% em meio aquoso (BÉRUBÉ et al., 2006), mostra duas fases de eliminação tendo a primeira fase uma meia-vida de 7 a 14h, e a segunda de 4 a 11 dias (GRAHAME-SMITH; ARONSON, 2002).

A ação farmacêutica do tamoxifeno é a de um antagonista do RE, formando um complexo relativamente estável com o receptor 17 β -estradiol e, assim, reduzir o número de receptores disponíveis (JORDAN et al., 1977). Estudos recentes demonstram que o tamoxifeno também tem propriedades agonísticas do estrogênio, dependendo da espécie e tecido (OSBORNE et al., 1997). Pela sua ação múltipla, o tamoxifeno é referido como sendo um modulador do RE (MUELLER; KORACH, 2001). Kawahara e Yamashita (2000) relataram que a inversão de sexo causada pela administração oral de 17 β -estradiol em “Medaka” (*Oryzias latipes*) foi completamente inibida pela administração do tamoxifeno.

Efeitos do tamoxifeno sobre a diferenciação do sexo gonadal foram relatados em aves (KOO et al., 1985) e em répteis (DORIZZI et al., 1991) com determinação do sexo dependente da temperatura. Nos peixes teleósteos, a ação do tamoxifeno pode variar dependendo da espécie. Em experimento realizado por Guiguen et al. (1999), os autores não conseguiram promover a inversão sexual da truta (*Oncorhynchus mykiss*) e tilápia (*Oreochromis niloticus*), usando doses de 5 e 20 mg kg⁻¹ de ração para a truta e 25 mg kg⁻¹ de ração para a tilápia. No linguado japonês, o tamoxifeno foi capaz de induzir a masculinização de peixes indiferenciados, sendo o efeito do tamoxifeno dependente da dose e capaz de atuar de forma eficiente nos receptores de estrógeno do tipo α e β (KITANO et al., 2007).

1.2.5.1 Ecotoxicidade do tamoxifeno

Além do tamoxifeno, grande variedade de compostos químicos naturais e sintéticos presentes no ambiente são capazes de afetar as vias de sinalização hormonal.

Indústrias como a plástica, de embalagens de alimentos, petróleo, pesticidas, produtos agrícolas e de produtos químicos produzem substâncias que atuam como disruptores endócrinos, entre eles destacam-se os solventes industriais, detergentes, pesticidas e fitoesteroides, que são capazes de induzir efeitos agonista ou antagonista do estrógeno no ambiente natural (WITORSCH, 2002).

O tamoxifeno também tem sido proposto para o uso como um agente de promoção do crescimento na aquicultura (PARK et al., 2003) e, neste contexto, representaria um risco adicional para os organismos aquáticos. Os autores avaliaram a utilização do tamoxifeno na sobrevivência e ganho de peso do bagre *Pseudobagrus fulvidraco*, mantidos em aquários por 60 dias e observou a redução nos índices de sobrevivência, e que o fármaco proporcionou maior crescimento e acúmulo de lipídeo. Contudo, o cultivo do bagre não alcançou o estágio para que pudesse ser avaliado economicamente.

Durante a década passada, anormalidades no sistema reprodutor masculino de peixes, répteis e mamíferos têm sido observadas e têm sido sugerido que perturbações químicas no ambiente podem ser responsáveis pelo aumento na incidência de anomalias reprodutivas (TOPPARI et al., 1996). Estudos mostram que a exposição de diversas espécies animais a um ou mais compostos químicos estrogênicos é capaz de induzir uma gama de efeitos adversos como hermafroditismo, hipospadia, criptorquidismo, redução do tamanho normal dos testículos, comprometimento do funcionamento normal das células de Leydig, redução da qualidade e quantidade de espermatozoides, alteração do ciclo estral, entre outros (LATHERS, 2002; WITORSCH, 2002). Como qualquer outro medicamento utilizado por humanos, o tamoxifeno pode contaminar o ambiente aquático, principalmente em efluentes de esgotos municipais e causar efeitos ecotoxicológicos (HILTON; THOMAS, 2003; ASHTON et al., 2004).

REFERÊNCIAS

AFONSO, L. O. B.; WASSERMANN, G. J.; TEREZINHA DE OLIVEIRA, R. Sex reversal in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* using a nonsteroidal aromatase inhibitor. **Journal of Experimental Zoology**, v. 290, n. 2, p. 177-181, 2001.

ANDERSSON, P. L.; BLOM, A.; JOHANNISSON, A.; PESONEN, M., TYSKLIND, M.; BERG, A. H.; OLSSON, P. E.; NORRGREN, L. Assessment of PCBs and hydroxylated PCBs as potential xenoestrogens: in vitro studies based on MCF-7 cell proliferation and induction of vitellogenin in primary culture of rainbow trout hepatocytes. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 37, n. 2, p. 145-150, 1999.

ASHTON, D.; HILTON, M.; THOMAS, K. V. Investigating the environmental transport of human pharmaceuticals to streams in the United Kingdom. **Science of The Total Environment**, v. 333, n. 1-3, p. 167-184, 2004.

BALDISSEROTTO, B. **Fisiologia de peixes aplicada à piscicultura**. Santa Maria: UFSM, 2002.

BARAS, E.; PRIGNON, C.; GOHOUNGO, G.; MÉLARD, C. Phenotypic sex differentiation of blue tilapia under constant and fluctuating thermal regimes and its adaptative and evolutionary implications. **Journal of Fish Biology**, v. 57, n. 1, p. 210-223, 2000.

BAROILLER, J. F.; CHOURROUT, D.; FOSTIER, A.; JALABERT, B. Temperature and sex-chromosomes govern sex-ratios of the mouthbrooding cichlid fish *Oreochromis niloticus*. **Journal of Experimental Zoology**, v. 273, n. 3, p. 216-223, 1995.

BAROILLER, J. F.; GUIGEN, Y.; FOSTIER, A. Endocrine and environmental aspects of sex differentiation in fish. **Cellular and Molecular Life Sciences**. v. 55, n. 6-7, p. 910-931, 1999.

BAROILLER, J. F.; JALABERT, B. Contribution of research in reproductive physiology to the culture of tilapias. **Aquatic Living Resources**. v. 2, n. 2, p. 105-116, 1989.

BEARDMORE, J. A.; MAIR, G. C.; LEWIS, R. I. Monosex male production in finfish as exemplified by tilapia: applications, problems, and prospects. **Aquaculture**, v. 197, n. 1-4, p. 283-301, 2001.

BÉRUBÉ, G.; RABOUIN, D.; PERRON, V.; N'ZEMBA, B.; GAUDREAU, R. C.; PARENT, S.; ASSELIN, E. Synthesis of unique 17 β -estradiol homo-dimers, estrogen receptors binding affinity evaluation and cytotoxic activity on breast, intestinal and skin cancer cell lines. **Steroids**, v. 71, n. 10, p. 911-921, 2006.

BLAZQUEZ, M.; BOSMA, P. T.; FRASER, E. J.; VAN LOOK, K. J. W.; TRUDEAU, V. L. Fish as models for the neuroendocrine regulation of reproduction and growth. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part C**, v. 119, n. 3, p. 345-364, 1998.

BOMBARDELLI, R. A.; SANCHES, E. A.; PINTO, D. F. H.; MARCOS, R. M.; BARBERO, R. M. Idade de maior sensibilidade de tilápia do Nilo aos tratamentos de masculinização por banhos de imersão. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 1, p. 1-7, 2007.

BORGES, A. M. **Piscicultura**. Brasília, DF: Emater, 2002.

BOSCOLO, W. R.; HAYASHI, C.; SOARES, C. M.; FURUYA, W. M.; MEURER, F. Desempenho e características de carcaça de machos revertidos de tilápias do nilo (*Oreochromis niloticus*), linhagens tailandesa e comum, nas fases inicial e de crescimento. **Revista Brasileira Zootecnia**, v. 30, n. 5, p. 1391-1396, 2001.

BRYSON, H.; PLOSKER, G. Tamoxifen: a review of pharmacoeconomic and quality-of-life considerations for its use as adjuvant therapy in women with breast cancer. **Pharmacoeconomics**, v. 4, n. 1, p. 40-66, 1993.

CARLSON, R. W. Scientific review of tamoxifen: overview from a medical oncologist. **Seminars in Oncology**, v. 24, n. 1, p. -151-157, 1997. Suplemento.

CHANG X. T.; KOBAYASHI T.; TODO, T.; IKEUCHI, T.; YOSHIURA, M.; KAJIURA-KOBAYASHI, H.; MORREY, C.; NAGAHAMA, Y. Molecular cloning of estrogen receptors a and b in the ovary of a teleost fish, the tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Zoological Science**, v. 16, n. 4, p. 653-658, 1999.

CHAPARRO, N. **Reproducción artificial y manipulación genética en peces**. Barranquilla: Editorial Mejoras, 1994.

CHOURROUT, D. Gynogenesis caused by ultraviolet irradiation of salmonid sperm. **Journal of Experimental Zoology**, v. 223, n. 2, p. 175-181, 1982.

CHOURROUT, D. Pressure-induced retention of second polar body and suppression of second polar body and suppression of first cleavage: production of all triploids, all tetraploids, heterozygous, homozygous diploid gynogenesis. **Aquaculture**, v. 36, n. 1-2, p. 111-126, 1984.

CONOVER, D. O.; KYNARD, B. O., Environmental sex determination: interaction of temperature and genotype in fish. **Science**, v. 213, n. 4507, p. 571-579, 1981.

CONOVER, D. O. Adaptive significance of temperature dependant sex determination in a fish. **American Naturalist**, v. 123, n. 3, p. 297-313, 1984.

CURTIS, L. R.; DIREN, F. T.; HURLEY, M. D.; SEIM, W. K.; TUBB, R. A. Disposition and elimination of 17 α -methyltestosterone in Nile tilapia. **Aquaculture**, v. 99, n. 1-2, p. 193-201, 1991.

DESPREZ, D.; BRIAND, C.; HOAREAU, M. C.; MÉLARD, C.; BOSC, P.; BAROILLER, J. F. Study of sex ratio in progeny of a complex *Oreochromis* hybrid, the Florida red tilapia. **Aquaculture**, v. 251, n. 1-4, p. 231-237, 2006.

DESPREZ, D.; GÉRAZ, E.; HOAREAU, M. C.; MÉLARD, C.; BOSC, P.; BAROILLER, J. F. Production of a high percentage of male offspring with a natural androgen, 11 β -hydroxyandrostenedione (11 β OHA4), in Florida red tilapia. **Aquaculture**, v. 216, n. 1, p. 55-65, 2003.

DEVLIN R. H.; NAGAHAMA, Y. Sex determination in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. **Aquaculture**, v. 208, n. 3-4, p. 191-364, 2002.

DIAZ, M. Análisis de viabilidad y crecimiento hasta El levante de triploides y diploides de tilapia nilótica (*Oreochromis niloticus*, Linné). **Boletim do INPA**, v. 2, n. 1, p. 33-45, 1994.

DORIZZI, M.; MIGNOT, T. M.; GUICHARD, A.; DESVAGES, G.; PIEAU, C. Involvement of oestrogens in sexual differentiation of gonads as a function of temperature in turtles. **Differentiation**, v. 47, n. 1, p. 9-17. 1991.

DUNHAN, R. A. Production and use of monosex or sterile fishes in aquaculture. **Review Aquatic Science**, v. 2, n. 1, p. 1-17. 1990.

FAO-Food and Agricultural Organization of the United Nations. Fisheries and Aquaculture Department. **The state of world fisheries and aquaculture 2008**. Roma, 2009.

FENSKE, M.; SEGNER, H., Aromatase modulation alters gonadal differentiation in developing zebrafish (*Danio rerio*). **Aquatic Toxicology**, v. 67, n. 2, p. 105-126, 2004.

GRAHAM, A. Genetic of fish: A summary of discussion. **Aquaculture**, v. 33, n. 1-4, p. 383-394, 1983.

GRAHAME-SMITH, D. G.; ARONSON, J. K. **Tratado de Farmacologia Clínica e Farmacoterapia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 2002.

GUIGUEN, Y.; BAROILLER, J. F.; RICORDEL, M. J.; ISEKI, K.; MCMEEL, O. M.; MARTIN, S. A. M.; FOSTIER, A. Involvement of estrogens in the process of sex differentiation in two fish species: The rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and a Tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Molecular Reproduction and Development**, v. 54, n. 2, p. 154-162, 1999.

HARRIES, J. E.; JANBAKHS, A.; JOBLING, S.; MATTHIESSEN, P.; SUMPTER, J. P.; TYLER, C.R. Estrogenic potency of effluent from two sewage treatment works in the United Kingdom. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 18, n. 5, p. 932-937, 1999.

HAWKINS, M. B.; THORNTON, J. W.; CREW, D.; SKIPPER, J. K.; DOTTE, A.; THOMAS, P. Identification of a third distinct estrogen receptor and reclassification estrogen receptors in teleost. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 20, p. 10751-10756, 2000.

HILTON, M. J.; THOMAS, K.;V. Determination of selected human pharmaceutical compounds in effluent and surface water samples by high-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1015, n. 1-2, p. 129-141, 2003.

HULATA, G. Genetic manipulations in aquaculture, a review of stock improvement by classical and modern technologies. **Genetica**, v. 111, n. 1-3, p. 155-173, 2001.

HUNTER, G. A.; DONALDSON, E. M. Hormonal sex control and its application to fish culture. In: HOAR, W. S.; RANDELL, D. J.; DONALDSON, E. M. **Fish physiology**. New York: Academic Press, 1983. v. 9b, p. 223-291.

JORDAN, V. C.; DIX, C. J.; ROWSBY, L.; PRESTWICH, G. Studies on the mechanism of action of the nonsteroidal antioestrogen tamoxifen (I.C.I. 46,474) in the rat. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 7, n. 2, p. 177-192, 1977.

KARAYÜCEL, I.; PENMAN, D.; KARAYÜCEL, S.; McANDREW, B. Thermal and hormonal feminization of all male YY Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. **The Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgeh**, v. 55, n. 2, p. 114-122, 2003.

KAWAHARA, T.; YAMASHITA, I. Estrogen-independent ovary formation in the medaka fish, *Oryzias latipes*. **Zoological Science**, v. 17, n. 1, p. 65-68, 2000.

KITANO, T.; TAKAMUNE, K.; NAGAHAM, Y.; ABE, S. Aromatase inhibitor and 17-alpha-methyltestosterone cause sex-reversal from genetical females to phenotypic males and suppression of P450 aromatase gene expression in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). **Molecular Reproduction and Development**, v. 56, n. 1, p. 1-5, 2000.

KITANO, T.; KOYANAGI, T.; ADACHI, R.; SAKIMURA, N.; TAKAMUNE, K. ABE, S. I. Assessment of estrogenic chemicals using an estrogen receptor α (ER α) and (ER β) mediated reporter gene assay in fish. **Marine Biology**, v. 149, n. 1, p. 49-55, 2006.

KITANO, T.; YOSHINAGA, N.; SHIRAISHI, E.; KOYANAGI, T. ABE, S. I. A tamoxifen induces masculinization of genetic females and regulates P450 aromatase and müllerian inhibiting substance mRNA expression in japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). **Molecular Reproduction and Development**, v. 74, n. 9, p. 1171-1177, 2007.

KOBAYASHI, T.; KAJIURA-KOBAYASHI, H.; NAGAHAMA, Y. Induction of XY sex reversal by estrogen involves altered gene expression in a teleost, tilapia. **Cytogenetics and Genome Research**, v. 101, n. 3-4, p. 289-294, 2003.

KOO, G. C.; ALLEN, H. L.; LONG, R. A.; SERIO.DUNN, R.; GOGGIN, B.; WEPPELMAN, R. M. Effect of tamoxifen on H-Y antigen expression and gonadal development in chicken embryos. **Differentiation**, v. 29, n. 2, p. 140-144, 1985.

KROON, F. J.; LILEY, N. R. The role of steroid hormones in protogynous sex change in the blackeye goby, *Coryphopterus nicholsii* (Teleostei:Gobiidae). **General and Comparative Endocrinology**, v. 118, n. 2, p. 273-283, 2000.

KUBITZA, F. **Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial**. Jundiaí: Divisão de biblioteca e Documentação, 2000.

KWON, J. Y.; HAGHPANAH, V.; KOGSON-HURTADO, L. M.; MCANDREW, B. J.; PENMAN, D. J. Masculinization of genetic female Nile tilapia *Oreochromis niloticus* by dietary administration of an aromatase inhibitor during sexual differentiation. **Journal of Experimental Zoology**, v. 287, n. 1, p. 46-53, 2000.

LATHERS, C. M. Endocrine disruptors: a new scientific role for clinical pharmacologists. Impact on human health, wildlife, and the environment. **Journal of Clinical Pharmacology**, v. 42, n. 1, p. 7-23, 2002.

LOPERA-BARRERO, N. M.; RIBEIRO, R. P.; POVH, J. A.; MENDEZ, L. D. V.; POVEDA-PARRA, A. R. **Produção de organismos aquáticos: uma visão no Brasil e no mundo**. Guaíba: Agrolivros, 2011.

LÓPEZ, C.; TORO, M. **Mejora genética de peces y moluscos**. Madrid: Ediciones Mundiprensa, 1990.

MAINARDES-PINTO, C. S. R.; FENERICH-VERANI, N.; DE CAMPOS, B. E. S.; DA SILVA, A. L. Masculinização de tilápia do nilo, *Oreochromis niloticus*, utilizando diferentes rações e diferentes doses de 17 α -metiltestosterona. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 3, p. 654-659, 2000.

MAIR, G. C.; BEARDMORE, J. A.; SKIBINSKI, D. O. F. Experimental evidence for environmental sex determination on *Oreochromis* species. In: ASIAN FISHERIES FORUM, 2., 1990, Manila. **Proceedings...** Manila: Asian Fisheries Society, 1990. p. 555-558.

MATTHEWS J.; GUSTAFSSON, J. A. Estrogen signaling: A subtle balance between ER α and ER β . **Molecular Intervention**, v. 3, p. 281-292, 2003.

MBAHINZIREKI, G.; DABROWSKI, K. Production of male tilapia by heat-treatment of embryos and growth on different diets in recirculation systems. In: ANNUAL MEETING OF THE WORLD AQUACULTURE SOCIETY, 28., 1997. **Proceedings...** Seattle: [s.n.], 1997. p. 19-23.

MENUET, A.; PELLEGRINI, E.; ANGLADE, I.; BLAISE, O.; LAUDET, V.; KAH, O.; PAKDEL, F. Molecular characterization of three estrogen receptor forms in zebrafish: Binding characteristics, transactivation properties, and tissue distributions. **Biology of Reproduction**, v. 66, n. 6, p. 1881-1892, 2002.

MEURER, F.; HAYASHI, C.; BOSCOLO, W. B.; SCHAMBER, C. R.; BOMBARDELLI, R. A. Fontes protéicas suplementadas com aminoácidos e minerais para tilápia do Nilo durante a reversão sexual. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 1, p. 1-6, 2005.

MUELLER, S. O.; KORACH, K. S. Mechanisms of estrogen receptor-mediated agonistic and antagonistic effects. In: METSLER, M. **The handbook of environmental chemistry**. Berlin: Springer-Verlag, 2001. v. 3, part 1, p. 12-25.

NAKAMURA, M.; TAKAHASHI, H. Gonadal sex differentiation in *Tilapia Oreochromis mossambicus*, with special regard to the time of estrogen treatment effective in inducing complete feminization of genetic males. **Bulletin of the Faculty of Fisheries**, v. 24, n. 1, p. 1-13, 1974.

NAKAMURA, M.; KOBAYASHI, T.; CHANG, X. T.; NAGHAMA, Y. Gonadal sex differentiation in teleost fish. **Journal of Experimental Zoology**, v. 281, n. 5, p. 362-372, 1998.

NAKAMURA, M.; BHANDARI, R. K.; HIGA, M. The role estrogens play in sex differentiation and sex changes of fish. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 28, n. 1-4, p. 113-117, 2003.

NEUMANN, E.; DIAS KOBERSTEIN, T. C. R.; DE SOUZA BRAGA, F. M. Desempenho de três linhagens de tilápia submetidas ao tratamento com 17 α -metiltestosterona em condições ambientais não controladas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n. 6, p. 973-979, 2009.

OLIVEIRA, J. S. Manipulação genômica em peixes (indução de triploidia). **Panorama da Aquicultura**, v. 9, n. 54, p. 43-47, 1999.

OLIVIER, A.; KAISER, H. A comparison of growth, survival rate, and number of marketable fish produced of swordtails, *Xiphophorus helleri* Heckel (Family Poeciliidae), between two types of culture systems. **Aquaculture**, v. 28, n. 3, p. 215-221, 1997.

OSBORNE, C. K.; ELLEDGE, R. M.; FUQUA, S. A. W. Estrogen receptors in breast cancer therapy. **Science & Medicine**, v. 3, n. 1, p. 32-41, 1996.

PANDIAN, T. J.; SHEELA, S. G. Hormonal induction of sex reversal in fish. **Aquaculture**, v. 138, n. 1, p. 1-22, 1995.

PARK, I. S.; OH, H. S.; KOO, J. G. Effect of oral tamoxifen on growth and survival in the bagrid catfish *Pseudobagrus fulvidraco*. **Aquaculture Research**, v. 34, n. 15, p. 1471-1474, 2003.

PAVLIDIS, M.; KOUMOUNDOUROS, G.; STERIOTI, A.; STERIOTI, A.; SOMARAKISDIVANACH, S. P.; KENTOURI, M. Evidence of temperature dependent sex determination in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). **Journal of Experimental Zoology**, v. 287, n. 3, p. 225–232, 2000.

PHELPS, R. P.; POPMA, T. J. Sex reversal of tilapia. In: COSTA-PIERCE, B. A.; RAKOCY, J. E. **Tilapia aquaculture in the americas**. Louisiana: The World Aquaculture Society, 2000. v. 2, p. 34-59.

PIFERRER, F.; BAKER, I. J.; DONALDSON, E. M. Effects of natural, synthetic, aromatizable, and nonaromatizable androgens in inducing male sex differentiation in genotypic female Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 91, n. 1, p. 59-65, 1993.

PIFERRER, F.; ZANUY, M.; CARRILLO, M.; SOLAR, I. I.; DEVLIN, R. H.; DONALDSON, E. M. Brief treatment with an aromatase inhibitor during sex differentiation causes chromosomally female salmon to develop as normal, functional males. **Journal of Experimental Zoology**. v. 270, n. 3, p. 255-262, 1994.

POPMA, T. J.; GREEN, B. W. Reversão sexual de tilápias em tanques de terra. In: MANUAL de produção em aquicultura. Flórida: Universitu Aurburn, 1990. 52 p.

RÖMER, U.; BEISENHERZ, W. Environmental determination of sex in *Apistogramma* Cichlidae. and two other freshwater fishes (Teleostei). **Journal of Fish Biology**, v. 48, n. 4, p. 714-725, 1996.

ROTHBARD, S.; ZOHAR, Y.; ZMORA, N.; SIVAN, B. L.; MOAV, B.; YARON, Z. Clearance of 17 α -ethynyltestosterone from muscle of sex-inversed tilapia hybrids treated for growth enhancement with two doses of the androgen. **Aquaculture**, v. 89, n. 3-4, p. 365-376, 1990.

RUBIN, D. A. Effect of pH on sex ratio in Cichlids and a Poecilliid (Teleostei). **Copeia**, v. 1985, n. 1, p. 233-235, 1985.

SIPAÚBA-TAVARES, L. H. Influência da luz, manejo e tempo de resistência sobre algumas variáveis limnológicas em um viveiro de piscicultura. **Biotemas**, v. 8, n. 1, p. 61-71, 1995.

SOCORRO, S.; POWER, D. M.; OLSSON, P. E.; CANARIO, A. V. M. Two estrogen receptors expressed in the teleost fish, *Sparus aurata*: cDNAcloning, characterization and tissue distribution. **Journal of Endocrinology**, v. 166, n. 2, p. 293-306, 2000.

SONNENSCHNEIN, C.; SOTO, A. M. An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 65, n. 1-6, p. 143-150, 1998.

STICKNEY, R. R. Tilapia update 1996. **World Aquaculture**, v. 28, n. 1, p. 20-25, 1997.

THORGAARD, G. H. Chromosome set manipulation and sex control in fish. In: HOAR, W. W.; RANDALL, D. J.; DONALDSON, E. M. (Ed.). **Fish physiology**. New York: Academic Press, 1983. v. 9, part B, p. 405-428.

THORGAARD, G. Ploidy manipulation and performance. **Aquaculture**, v. 57, n. 1, p. 57-64, 1986.

TOGUYENI, A.; FAUCONNEAU, B.; BOUJARD, T.; FOSTIER, A.; KUHN, E. R.; MOL, K. A.; BAROILLER, J. F. Feeding behaviour and food utilisation in tilapia, *Oreochromis niloticus*: effect of sex ratio and relationship with the endocrine status. **Physiology & Behavior**, v. 62, n. 2, p. 273-279, 1997.

TOGUYENI, A.; FAUCONNEAU, B.; FOSTIER, A.; ABUCAY, J.; MAIR, G.; BAROILLER, J. F. Influence of sexual phenotype and genotype, and sex ratio on growth performances in tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture**, v. 207, n. 3-4, p. 249-261, 2002.

TOPPARI, J.; LARSEN, J. C.; CHRISTIANSEN, P.; GIWERCMAN, A.; GRANDJEAN, P.; GUILLETTE, L. J.; JEGOU, B.; JENSEN, T. K.; JOUANNET, P.; KEIDING, N. Male reproductive health and environmental xenoestrogens. **Environmental Health Perspectives**, v. 104, suppl 4, p. 741-803, 1996.

UCHIDA, D.; YAMASHITA, M.; KITANO, T.; IGUCHI, T. An aromatase inhibitor or high water temperature induce oocyte apoptosis and depletion of P450 aromatase activity in the gonads of genetic female zebrafish during sex-reversal. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 137A, n. 1, p. 11-20, 2004.

VARADARAJ, K.; PANDIAN, T. J. First report on production of supermale tilapia by integrating endocrine sex reversal with gynogenetic technique. **Current Science**, v. 58, n. 8, p. 434-441, 1989.

WITORSCH, R. J. Endocrine Disruptors: can biological effects and environmental risks be predicted. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 36, n. 1, p. 118-130, 2002.

WOHLFARTH, F. W.; HULARA, G. I. **Applied genetics of tilapias**. Manila: ICLARM Studies and Reviews, 1981. v. 6.

WOHLFARTH, G. Genetics of fish: Application to warm water fishes. **Aquaculture**, v. 33, n. 1-4, p. 373-381, 1994.

XIA, Z.; PATIÑO, R.; GALE, W. L.; MAULE, A. G.; DENSMORE, L. D. Cloning, in vitro expression, and novel phylogenetic classification of a channel catfish estrogen receptor. **General and Comparative Endocrinology**, v. 113, n. 3, p. 360-368, 1999.

XIA, Z.; GALE, W. L.; CHANG, X.; LANGENAU, D.; PATIÑO, R.; MAULE, A. G.; DENSMORE, L. D. Phylogenetic sequence analysis, recombinant expression, and tissue distribution of a channel catfish estrogen receptor β . **General and Comparative Endocrinology**, v. 118, n. 1, p. 139-149, 2000.

YAMAZAKI, F. Sex control and manipulation in fish. **Aquaculture**, v. 33, n. 1-4, p. 329-354, 1983

YANG, Y.; ZHANG, Z.; LIN, K.; WEI, Y.; HUANG, E.; GAO, A.; XU, Z.; KE, S.; WEI, J. Use of three line combination for production of genetic all-male tilapia mossambica. **Acta Scientia Sinica**, v. 7, n. 3, p. 241-246, 1980.

ZANARDI, M. F.; DIAS KOBERSTEIN, T. C. R.; URBINATI, E. C.; FAGUNDES, M.; DOS SANTOS, M. A.; MATAQUEIRO, M. I. Concentrações de hormônio na carcaça de tilápias-do-nilo e maturação precoce após reversão sexual. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 1, p. 7-11, 2011.

II – OBJETIVOS GERAIS

Este estudo foi realizado com os seguintes objetivos:

- 1- avaliar a influência do citrato de tamoxifeno na inversão sexual da tilápia do Nilo e se esse agente pode ser causador de alterações na sobrevivência das larvas;
- 2- avaliar a influência da temperatura na inversão sexual da tilápia do Nilo variedade Supreme, bem como se esse agente físico pode ser causador de alterações morfológicas e de redução de sobrevivência;
- 3- descrever as gônadas de alevinos de tilápia do Nilo com 75 dias, utilizando métodos citológicos, estruturais e ultraestruturais.

III – Avaliação da eficiência do citrato de tamoxifeno, na inversão sexual de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)

RESUMO. O experimento foi realizado com o objetivo de avaliar a influência do tamoxifeno na inversão sexual de larvas de tilápia a partir dos dois dias de vida. Os animais foram distribuídos em um delineamento experimental de cinco tratamentos e três repetições, recebendo dietas com diferentes quantidades de tamoxifeno: 0, 25, 50, 75 e 100 mg kg⁻¹ de ração. Após 28 dias de tratamento, as larvas restantes em cada tratamento foram contadas e transferidas para caixas de água de 500 L onde receberam dieta contendo 28% de proteína bruta por 60 dias. Após este período, os alevinos foram sexados pelo método “squash”. A sobrevivência $75,5 \pm 5,74$; $73 \pm 4,76$; $66 \pm 11,19$; $76,5 \pm 4,12$; $75 \pm 3,46\%$ e a porcentagem média de indivíduos machos $62,5 \pm 5$; $70 \pm 8,1$; $60 \pm 8,2$; $70 \pm 0,0$; $62,5 \pm 9,5\%$ para os tratamentos 0, 25, 50, 75 e 100 mg de tamoxifeno kg⁻¹ de ração, respectivamente, não apresentaram diferenças estatísticas significativas. O número de gônadas presentes em cada indivíduo apresentou redução significativa, nos tratamentos com 75 e 100 mg de tamoxifeno ($89,3 \pm 0,527$ e $79,3 \pm 0,378\%$) quando comparado com os tratamentos 0, 25 e 50 mg de tamoxifeno ($98,9 \pm 1,0$; $97,6 \pm 1,0$ e $94,5 \pm 1,0\%$, respectivamente), a estrutura histológica das gônadas femininas não apresentou diferenças e os ovários em todos os tratamentos apresentaram ovócitos bem definidos e em vários estádios de maturação.

Palavras-chave: receptor de estrógeno, monossexo, desruptor endócrino.

Evaluation of tamoxifen citrate efficiency on sexual inversion of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)

ABSTRACT. The experiment was conducted to evaluate the influence of tamoxifen on sexual inversion of Nile tilapia larvae from two days of life, they were divided into an experimental design of five treatments and three replicates, and fed diets with different amounts of tamoxifen: 0, 25, 50, 75 and 100 mg kg⁻¹ of feed. After 28 days of treatment, the larvae remaining in each treatment were counted and transferred to water tanks of 500 liters which were fed with a diet containing 28% crude protein for 60 days. After this period the fry were sexed by the "squash". The survival 75.5 ± 5.74 , 73 ± 4.76 , 66 ± 11.19 , 76.5 ± 4.12 , 75 ± 3.46 and average percentage of male individuals 62.5 ± 5 , 70 ± 8.1 , 60 ± 8.2 , 70 ± 0.0 , 62.5 ± 9.5 for treatments 0, 25, 50, 75 and 100 mg of tamoxifen kg⁻¹ diet, respectively, showed no statistically significant differences. The

number of gonads in each subject experienced a significant reduction in the treatments with 75 and 100 mg of tamoxifen (89.3 and $79.3 \pm 0.527 \pm 0.378$) when compared with treatments 0, 25 and 50 mg of tamoxifen ($98, 9 \pm 1.0$, 97.6 ± 1.0 and 94.5 ± 1.0 , respectively), the histological structure of female gonads did not differ and ovaries in all treatments showed well-defined oocytes at various stages of maturation.

Keywords: estrogen receptor, monosex, endocrine disruptor.

Introdução

O cultivo de peixes monossexo é desejável em diversos sistemas de produção aquícola, sendo que os benefícios de sua utilização incluem a maior taxa de crescimento, eliminação de reprodução, redução do comportamento territorial, redução da variação no tamanho de despesca e redução do risco de impacto ambiental resultante da fuga de espécies exóticas (BEARDMORE et al., 2001).

Atualmente, o método mais prático e eficiente para a obtenção de populações monossexas de tilápias é pela incorporação de hormônios esteroides à ração, sendo o 17α -metiltestosterona o mais utilizado (PHELPS; POPMA, 2000). A utilização deste esteroide na produção de monossexo de peixes, já foi questionada no passado. Sobre isto, Johnstone et al. (1983) afirmaram que seu uso preocupa pelos resíduos que podem permanecer nos peixes tratados e que podem ser transferidos ao consumidor, ou liberados no ambiente, contudo Zanardi et al. (2011) observaram que em alevinos tratados 17α -metiltestosterona, a quantidade deste andrógeno, 30 dias após o término do período de reversão, eram semelhantes aos níveis de produção endógena.

Na maioria dos vertebrados, os embriões têm gônada bipotencial que pode evoluir para um ovário ou testículo. As gônadas de peixes em geral são muito instáveis em relação à determinação do sexo, uma interação gene/ambiente, determina o desenvolvimento sexual futuro (DEVLIN; NAGAHAMA, 2002; PIFERRER; GUIGEN, 2008).

A atuação dos estrógenos na diferenciação ovariana está firmemente estabelecida na maioria dos vertebrados, entre os quais: aves (SMITH; SINCLAIR, 2004), répteis (PIEAU; DORIZZI, 2004), anfíbios (HAYES, 1998; MIYATA; KUBO, 2000) e peixe (DEVLIN; NAGAHAMA, 2002). Nos peixes, é possível comprovar a importância dos estrógenos pela presença de enzimas responsáveis pela esteroidogênese ou pelo estrógeno produzido na época da diferenciação sexual (NAKAMURA et al., 2003; BHANDARI et al., 2006), outra comprovação é a constatação de que o

tratamento com estrógeno exógeno feminiza sexualmente peixes indiferenciados de diferentes espécies (PIFERRER, 2001).

A ação do estrógeno é mediada por, pelo menos, dois receptores, denominados α (RE α) e β (RE β), que são membros da família de receptores nucleares. A ligação entre o receptor e o estrógeno regula a expressão de genes diretamente, pela sua vinculação a um cis-elemento, denominado elemento estrogênio responsivo (EER) ou indiretamente por meio da interação com outros fatores de transcrição específica (MATTHEWS; GUSTAFSSON, 2003). Nos peixes teleósteos, a existência de dois subtipos de RE foi confirmada em *Oreochromis niloticus* (CHANG et al., 1999); *Sparus aurata* (SOCORRO et al., 2000); *Ictalurus punctatus* (XIA et al., 1999, 2000); *Paralichthys olivaceus* (KITANO et al., 2006).

O tamoxifeno é composto derivado do trifeniletileno, amplamente utilizado no tratamento de câncer de mama primário e recorrente (CARLSON, 1997), sendo facilmente absorvido via oral, atingindo níveis plasmáticos máximos 4 a 7h após a ingestão. Este fármaco, que possui solubilidade de 0,01% em meio aquoso (BÉRUBÉ et al., 2006), mostra duas fases de eliminação tendo a primeira fase uma meia-vida de 7 a 14h, e a segunda de quatro a 11 dias. (GRAHAME-SMITH; ARONSON, 2002).

A ação farmacêutica do tamoxifeno é a de um antagonista do RE, formando um complexo relativamente estável com o receptor 17 β -estradiol e, assim, reduzir o número de receptores disponíveis (JORDAN et al., 1977). Estudos recentes demonstraram que o tamoxifeno também tem propriedades agonísticas do estrogênio, dependendo da espécie e tecido (OSBORNE et al., 1996). Pela sua ação múltipla, o tamoxifeno é referido como sendo um modulador do RE (MUELLER; KORACH, 2001).

Efeitos do tamoxifeno sobre a diferenciação do sexo gonadal foram relatados em aves (KOO et al., 1985) e em répteis (DORIZZI et al., 1991) com determinação do sexo dependente da temperatura. Nos peixes teleósteos, a ação do tamoxifeno pode variar dependendo da espécie, em experimento realizado por Guiguen et al. (1999). Os autores não conseguiram promover a inversão sexual da truta (*Oncorhynchus mykiss*) e tilápia (*Oreochromis niloticus*), usando doses de 5 e 20 mg kg⁻¹ de ração para a truta e 25 mg kg⁻¹ de ração para a tilápia. No linguado japonês, o tamoxifeno foi capaz de induzir a masculinização de peixes indiferenciados, sendo o efeito dependente da dose e capaz de atuar de forma eficiente nos receptores de estrógeno do tipo α e β (KITANO et al., 2007).

Esse experimento avaliou se a inversão sexual da tilápia do Nilo (*O. niloticus*) pode ser obtida pela ação do citrato de tamoxifeno em diferentes dosagens e períodos de tratamento.

Material e métodos

O experimento foi realizado no Laboratório de Reprodução de Espécies Nativas da Estação de Piscicultura da Universidade Estadual de Londrina (Epuel), no período de 09 de junho a 06 de agosto de 2011 (duração: 59 dias). A qualidade de água das unidades experimentais foi mantida pela sifonagem dos resíduos e das fezes e pela renovação constante; a temperatura foi mantida a 26,0°C com o auxílio de termostatos e aquecedores elétricos.

Foram realizadas semanalmente coletas de amostras de água, para a avaliação das seguintes variáveis de qualidade de água: pH (potenciômetro digital), oxigênio dissolvido (mg L^{-1}) e temperatura ($^{\circ}\text{C}$) (oxímetro YSI - *Yellow Spring Instruments*), alcalinidade CaCO_3 (mg L^{-1}) (titulação) e amônia (mg L^{-1}) (colorimétrico), utilizando a metodologia de Golterman et al. (1978).

As larvas de tilápia do Nilo (*O. niloticus*), variedade Supreme com dois dias pós-eclosão, utilizadas nesse experimento foram provenientes da Piscicultura Aquabel (Rolândia, Estado do Paraná). Após serem transportadas até a Epuel, as larvas foram separadas ao acaso em 20 grupos de 50 animais, e distribuídas nas unidades experimentais, as quais eram constituídas por recipientes plásticos com volume de 40 L. Após um dia de aclimação, as larvas passaram a receber quatro vezes ao dia (“ad libitum”) as dietas experimentais, contendo 0, 25, 50, 75 e 100 mg de Citrato de Tamoxifeno por kilograma de ração com 42% de proteína, o Citrato de Tamoxifeno foi pesado em balança de precisão, macerado em cadinho e diluído em 500 mL de álcool e só então misturado à ração. A dieta controle foi preparada misturando-se a 1,0 kg de ração e 500 mL de álcool. Após a evaporação do álcool, as rações que formaram os diferentes tratamentos e controle foram empacotadas e guardadas em um freezer a -4°C .

O crescimento das larvas durante o experimento foi avaliado por meio de biometrias realizadas, sendo que na biometria inicial uma amostra de 15 indivíduos foi retirada ao acaso antes de serem distribuídas nas unidades experimentais. Outras amostras de cinco indivíduos foram tomadas no 14^o e 28^o dias de tratamento. Nas três coletas, os animais foram insensibilizados com benzocaína ($3 \text{ g } 100 \text{ mL}^{-1}$ de álcool), sacrificadas em álcool 70, e armazenados em frascos de vidro identificados por tratamento. Posteriormente, as larvas foram medidas com o auxílio de um paquímetro digital, secas em papel toalha e pesadas em balança analítica. Para o cálculo de sobrevivência, as larvas sacrificadas durante as biometrias não foram consideradas.

Após essa fase, as larvas foram transferidas para caixas d'água plásticas de 500 L. A temperatura, durante essa fase, foi mantida em 26°C com o auxílio de um aquecedor. O manejo alimentar foi realizado duas vezes ao dia, oferecendo-se ração comercial com 28% de proteína bruta, até a saciação; a cada dois realizou-se a sifonagem dos restos de alimento e fezes, retirando de cada unidade experimental um volume aproximado de 1.000 mililitros (2,5%) de água em cada procedimento.

Após 60 dias, dez indivíduos de cada repetição foram escolhidos aleatoriamente, anestesiados com o auxílio de benzocaína, sacrificados em solução bouin, armazenados em vidros com identificação e, posteriormente, colocados em álcool 70. Para a análise da porcentagem de inversão sexual, os alevinos tiveram seu peso e medidas tomados com o auxílio de uma balança de precisão e um paquímetro digital. A cavidade abdominal foi aberta com o auxílio de tesoura e pinça, e as gônadas avaliadas quanto ao número presente em cada animal. Após a determinação do número de gônadas presentes, essas foram retiradas, pesadas e transferidas para uma lâmina, onde foram coradas com acetato-carmim, prensadas com o auxílio de uma lamínula (Squash) e avaliadas em microscopia óptica em aumento de 40 vezes.

Foi sacrificada uma amostra de dez indivíduos de cada tratamento, após serem anestesiados com o auxílio de benzocaína, suas gônadas retiradas e fixadas em solução de Bouin. Após 12h no fixador, as gônadas foram lavadas em água e desidratadas em uma bateria de álcool e diafanizadas em xilol, incluídas em paraplast e cortadas na espessura de 5 µm. Os cortes foram corados com hematoxilina-eosina e observados em microscopia de luz.

Os dados obtidos de sobrevivência, porcentagem de machos e número de gônadas, por apresentarem uma caracterização binária, em que se verifica a sobrevivência ou a morte, a ocorrência de machos ou fêmeas e a presença de uma ou de duas gônadas, foram submetidos a análises estatísticas utilizando a metodologia de modelos lineares generalizados, implementado no PROC GENMOD do sistema computacional SAS. Para as variáveis, considerou-se a distribuição binomial com função ligação logit. Ajustou-se uma regressão logística da porcentagem de sobrevivência e ocorrência de machos em função das diferentes temperaturas de cultivo.

Para avaliar o ganho em peso dos animais submetidos aos diferentes tratamentos nesse experimento, os resultados de peso final obtidos na última biometria foram submetidos ao teste de análise de variância.

Resultados e discussão

Os resultados obtidos das variáveis físicas e químicas da água, no interior das unidades experimentais foram: temperatura da água: $26 \pm 1,5^{\circ}\text{C}$; oxigênio dissolvido (mg L^{-1}): $4,8 \pm 0,5$; pH: $6,9 \pm 0,2$; alcalinidade total: 60 mg L^{-1} e amônia total: $< 0,5$ ppm. Esses resultados, de acordo com Boyd (1990) e Popma e Lovshin (1996), estão dentro do considerado como sendo o recomendado para a aquicultura e na faixa de conforto para a espécie estudada.

Na biometria inicial, os indivíduos amostrados apresentavam os seguintes valores médios de peso e comprimento total: $0,00134 \pm 0,00029 \text{ g}$ e $10,542 \pm 0,41 \text{ mm}$, respectivamente. Os dados, avaliados estatisticamente, não apresentaram diferença, demonstrando um grupo homogêneo. Bombardelli e Hayashi (2005), após testarem a inversão sexual de *Oreochromis niloticus* utilizando banhos de imersão com 17α -metiltestosterona, em larvas que mediam de 9,10 a 13,30 mm, obtiveram melhores resultados de masculinização utilizando larvas de 13,30 mm, sugerindo que esse tamanho pode ser considerado como início do período ontogênico de maior sensibilidade à ação hormonal, nessa espécie.

As médias de ganho em peso obtidas nas biometrias das larvas de tilápia do Nilo submetidas aos diferentes tratamentos foram utilizadas na curva de ganho em peso (Figura 1).

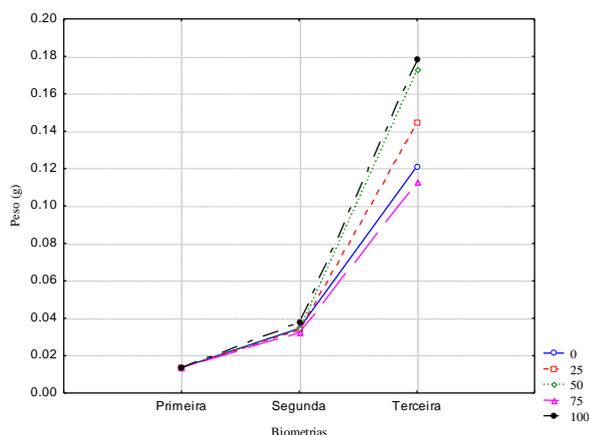


Figura 1. Curva de ganho em peso de larvas de tilápia do Nilo variedade Supreme, submetidas a tratamentos com dietas contendo diferentes quantidades de citrato de tamoxifeno (0, 25, 50, 75 e 100 mg kg^{-1} de ração), por um período de 28 dias.

Os valores de peso final das larvas submetidas aos tratamentos 0, 25, 50, 75 e 100 mg de citrato de tamoxifeno kg^{-1} de ração foram, respectivamente, $0,121 \pm 0,0300$; $0,144 \pm 0,038$; $0,173 \pm 0,0402$; $0,112 \pm 0,040$ e $0,178 \pm 0,061$ g e não apresentaram diferenças estatísticas significativas. O coeficiente de variação de 57,15% demonstra crescimento heterogêneo, e segundo Volpato et al. (1989), o crescimento heterogêneo entre larvas e alevinos de tilápia, é uma característica comum e está relacionada ao estabelecimento de hierarquias entre os peixes.

Os valores encontrados para sobrevivência foram $75,5 \pm 5,74$; $73 \pm 4,76$; $66 \pm 11,19$; $76,5 \pm 4,12$; $75 \pm 3,46\%$ para os tratamentos 0, 25, 50, 75 e 100 mg de citrato de tamoxifeno kg^{-1} de ração respectivamente. A análise estatística demonstrou não haver diferenças estatísticas entre as médias da porcentagem nesse experimento, as quais são menores que as obtidas por Hines e Watts (1995) que encontraram valores de sobrevivência entre 84 a 90% de larvas de tilápia (*O. niloticus* x *O. aureus*) alimentadas com dietas contendo tamoxifeno, os autores ainda relatam que não encontraram diferenças significativas de sobrevivência. Segundo Cruz e Mair (1994), a sobrevivência está relacionada a fatores sociais de dominância já que indivíduos dominantes dentro de uma população podem consumir mais alimentos e crescer mais rápido, deixando menos alimento para os indivíduos submissos que têm menor crescimento e que, portanto se tornam vulneráveis ao canibalismo e a morte por inanição.

As médias de sobrevivência obtidas nesse experimento variaram entre $66 \pm 11,19$ a $76,5 \pm 4,12\%$, os quais estão próximos aos considerados ideais por Popma e Green (1990) para larvas com 28 dias mantidas em ambientes externos, que segundo os autores varia entre 70 a 90%, contudo este experimento foi realizado em condições controladas em tanques internos e, segundo Phelps e Popma (2000), a inversão sexual quando realizada em tanques internos apresentam mortalidade maior do que em tanques ao ar livre. Popma (1987) relatou uma taxa de apenas 40% de sobrevivência quando *O. niloticus* foi submetida à inversão de sexo em tanques internos, resultado menor que os obtidos nesse experimento.

Os resultados de inversão sexual: $62,5 \pm 5$; $70 \pm 8,1$; $60 \pm 8,2$; $70 \pm 0,0$; $62,5 \pm 9,5\%$ para os tratamentos 0, 25, 50, 75 e 100 mg de citrato de tamoxifeno kg^{-1} ração, respectivamente, não apresentaram diferenças estatísticas ($p < 0,05$), o que difere dos resultados obtidos por Hines e Watts (1995) que estudando a ação de substâncias não-esteroides (citrato de tamoxifeno) na inversão sexual de híbridos de tilápia (*Oreochromis*

niloticus x *O. aureus*), obtiveram resultados que variaram de 66 a 100% de inversão sexual das larvas alimentadas com 5 a 100 mg kg⁻¹ de tamoxifeno presente na dieta.

A ação do tamoxifeno, segundo Nagahama (2005), é a de antagonista do receptor de estrógeno em fêmeas genéticas e, portanto altera o fenótipo fêmea para macho, o que reforça a ideia de que o estrógeno endógeno e seus receptores têm papel importante na diferenciação dos ovários de tilápia. Contudo, nesse experimento, o tamoxifeno não foi efetivo na inversão sexual de tilápias.

Experimentos realizados por Guiguen et al. (1999) também não obtiveram resultados positivos na inversão sexual de Trutas (*Oncorhynchus mykiss*) utilizando 5 e 20 mg de tamoxifeno por quilograma de ração e também na Tilápia (*Oreochromis niloticus*) na quantidade de 25 mg kg⁻¹ de ração. Os autores, ainda, sugerem que a possível explicação para a falta de resultados pode ser por um efeito agonista do tamoxifeno, uma vez que quando formado o complexo tamoxifeno-receptor de estrógeno, o receptor pode permanecer parcialmente ativo e, portanto, capaz de transmitir tanto os efeitos estrogênicos como os antiestrogênicos (JORDAN, 1977). Esse efeito estrogênico foi comprovado por Navarro-Martín et al. (2009) que em estudos realizados com *Dicentrarchus labrax* alimentados com dietas, contendo 100 mg citrato de tamoxifeno, obtiveram 100% de fêmeas.

A quantidade de gônadas pares presentes em cada animal nos tratamentos que utilizaram 75 e 100 mg de citrato de tamoxifeno kg⁻¹ de ração ($89,3 \pm 0,527$ e $79,3 \pm 0,378\%$) sofreu redução significativa quando comparada aos tratamentos 0, 25 e 50 mg ($98,9 \pm 1,0$; $97,6 \pm 1,0$ e $94,5 \pm 1,0\%$, respectivamente) (Figura 2).

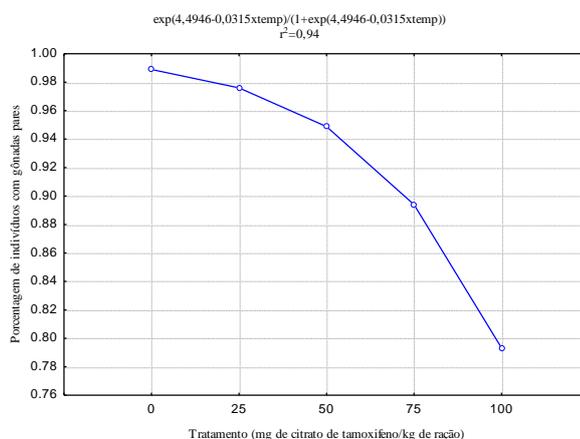


Figura 2. Curva e reta de regressão do número de gônadas pares observadas em alevinos de tilápia do Nilo submetidas a dietas contendo diferentes quantidades de citrato de tamoxifeno na dieta.

Segundo Hines e Watts (1995), o uso de altas dosagens (acima de 150 mg) de citrato de tamoxifeno, influencia o desenvolvimento das gônadas, aumentando a incidência de anormalidades, e também causando problemas na formação óssea do animal.

O citrato de tamoxifeno é considerado um desregulador endócrino, que atua ligando-se a receptores de estrógeno nas células do ovário e do cérebro, competindo ou mimetizando a ação do hormônio estrogênio, estimulando a ação (agonista) ou bloqueando e reduzindo a ação do efeito biológico (antagonista), e, segundo Sharpe et al. (2004), este processo pode desregular a síntese hormonal, transporte e metabolismo, resultando em mudanças organizacional e funcional do órgão alvo. Neste experimento, apesar de haver uma redução significativa no número de gônadas presentes nos indivíduos do tratamento com 75 e 100 mg de citrato de tamoxifeno kg^{-1} de ração, a análise dos cortes histológicos (Figura 3) demonstrou não haver alterações estruturais na histologia nos ovários nos diferentes tratamentos, os quais apresentavam ovócitos em diferentes estádios de maturação com núcleos e citoplasma evidentes demonstrando desenvolvimento normal.

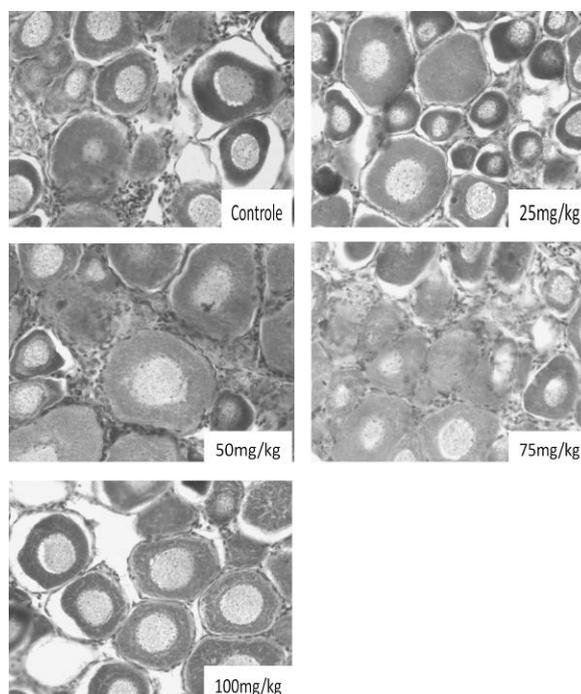


Figura 3. Micrografias de gônadas de tilápia do Nilo, coradas com hematoxilina-eosina e observadas em aumento de 40 vezes, submetidas a diferentes dietas contendo citrato de tamoxifeno. Os ovários apresentam ovócitos normais em diferentes estádios de maturação.

Conclusão

Pelos resultados obtidos neste experimento, pode-se concluir que o Citrato de tamoxifeno não promoveu a inversão sexual de tilápias. A redução do número de gônadas em indivíduos submetidos aos tratamentos com 75 e 100 mg de citrato de tamoxifeno aponta para a possibilidade do fármaco ser utilizado na produção de animais estéreis, o que sugere a realização de novos estudos que possam esclarecer essa possibilidade.

Referências

BEARDMORE, J. A.; MAIR, G. C.; LEWIS, R. I. Monosex male production in finfish as exemplified by tilapia: applications, problems, and prospects. **Aquaculture**, v. 197, n. 1-4, p. 283-301, 2001.

BÉRUBÉ, G.; RABOUIN, D.; PERRON, V.; N'ZEMBA, B.; GAUDREAULT, R. C.; PARENT, S.; ASSELIN, E. Synthesis of unique 17 α -estradiol homo-dimers, estrogen receptors binding affinity evaluation and cytotoxic activity on breast, intestinal and skin cancer cell lines. **Steroids**, v. 71, n. 10, p. 911-921, 2006.

BHANDARI, R. K.; NAKAMURA, M.; KOBAYASHI, T.; NAGAHAMA, Y. Suppression of steroidogenic enzyme expression during androgen-induced sex reversal in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 145, n. 1, p. 20-24, 2006.

BOMBARDELLI, R. A.; HAYASHI, C. Masculinização de larvas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.) a partir de banhos de imersão com 17 alfa-metiltestosterona. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 2, p. 365-372, 2005.

BOYD, C. **Water quality in ponds for aquaculture**. London: Birmingham, 1990.

CARLSON, R. W. Scientific review of tamoxifen: overview from a medical oncologist. **Seminars in Oncology**, v. 24, n. 1, p. 151-157, 1997. Suplemento.

CHANG, X. T.; KOBAYASHI, T.; TODO, T.; IKEUCHI, T.; YOSHIURA, M.; KAJIURA-KOBAYASHI, H.; MORREY, C.; NAGAHAMA, Y. Molecular cloning of estrogen receptors a and b in the ovary of a teleost fish, the tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Zoological Science**, v. 16, n. 4, p. 653-658, 1999.

CRUZ, E. M. V.; MAIR, G. C. Conditions for effective androgen sex reversal in *Oreochromis niloticus* (L.). **Aquaculture**, v. 122, n. 2-3, p. 237-248, 1994.

DEVLIN, R. H.; NAGAHAMA, Y. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. **Aquaculture**, v. 208, n. 3-4, p. 191-364, 2002.

DORIZZI, M.; MIGNOT, T. M.; GUICHARD, A.; DESVAGES, G.; PIEAU, C. Involvement of oestrogens in sexual differentiation of gonads as a function of temperature in turtles. **Differentiation**, v. 47, n. 1, p. 9-17, 1991.

GOLTERMAN, H. L.; CLYMO, R. S.; OHNSTAD, M. A. M. **Methods for physical and chemical analysis of fresh waters**. Oxford: Blackwell Scientific, 1978.

GRAHAME-SMITH, D. G.; ARONSON, J. K. **Tratado de farmacologia clínica e farmacoterapia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

GUIGUEN, Y.; BAROILLER, J. F.; RICORDEL, M. J.; ISEKI, K.; McMEEL, O. M.; MARTIN, S. A. M.; FOSTIER, A. Involvement of estrogens in the process of sex differentiation in two fish species: The rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and a tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Molecular Reproduction and Development**, v. 54, n. 2, p.154-162, 1999.

HAYES, T. B. Sex determination and primary sex differentiation in amphibians: Genetic and developmental mechanisms. **Journal of Experimental Zoology**, v. 281, n. 5, p. 373-399, 1998.

HINES, G. A.; WATTS, S. A. Nonsteroidal chemical sex manipulation of tilapia. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 26, n. 1, p. 98-102, 1995.

JOHNSTONE, R.; MACINTOSH D. J.; WRIGHT R. S. Elimination of orally administered 17 α -methyltestosterone by *Oreochromis mossambicus* (Tilapia) and *Salmo gardneri* (Rainbow trout) juveniles. **Aquaculture**, v. 35, p. 249-257, 1983.

JORDAN, V. C.; DIX, C. J.; ROWSBY, L.; PRESTWICH, G. Studies on the mechanism of action of the nonsteroidal antioestrogen tamoxifen (I.C.I. 46,474) in the rat. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 7, n. 2, p. 177-192, 1977.

KITANO, T.; KOYANAGI, T.; ADACHI, R.; SAKIMURA, N.; TAKAMUNE, K.; ABE, S. I. Assessment of estrogenic chemicals using an estrogen receptor α (ER α)- and ER β - mediated reporter gene assay in fish. **Marine Biology**, v. 149, n. 1, p. 49-55, 2006.

KITANO, T.; YOSHINAGA, N.; SHIRAISHI, E.; KOYANAGI, T. ABE, S. I. A tamoxifen induces masculinization of genetic females and regulates P450 aromatase and müllerian inhibiting substance mRNA expression in japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). **Molecular Reproduction and Development**, v. 74, n. 9, p. 1171-1177, 2007.

KOO, G. C.; ALLEN, H. L.; LONG, R. A.; SERIO-DUNN, R.; GOGGIN, B.; WEPPELMAN, R. M. Effect of tamoxifen on H-Y antigen expression and gonadal development in chicken embryos. **Differentiation**, v. 29, n. 2, p. 140-144, 1985.

MATTHEWS J.; GUSTAFSSON, J. A. Estrogen signaling: A subtle balance between ER α and ER β . **Molecular Intervention**, v. 3, p. 281-292, 2003.

MIYATA, S.; KUBO, T. In vitro effects of estradiol and aromatase inhibitor treatment on sex differentiation in *Xenopus laevis* gonads. **General and Comparative Endocrinology**, v. 119, n. 1, p. 105-110, 2000.

MUELLER, S. O.; KORACH, K. S. Mechanisms of estrogen receptor-mediated agonistic and antagonistic effects. In: METSLER, M. **The handbook of environmental chemistry**. Part I, vol. 3. Berlin: Springer-Verlag, 2001. v. 3, part 1, p. 12-25.

NAGAHAMA, Y. Molecular mechanisms of sex determination and gonadalsex differentiation in fish. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 31, n. 2, p.105-109, 2005.

NAKAMURA, M.; BHANDARI, R. K.; HIGA, M. The role estrogens play in sex differentiation and sex changes of fish. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 28, n. 1-4, p. 113-117, 2003.

NAVARRO-MARTIN, L.; BLÁQUEZ, M.; PIFERRER, F. Masculinization of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) by treatment with an androgen or aromatase inhibitor involves different gene expression and has distinct lasting effects on maturation. **General and Comparative Endocrinology**, v. 160, n. 1, p. 3-11, 2009.

OSBORNE, C. K.; ELLEDGE, R. M.; FUQUA, S. A. W. Estrogen receptors in breast cancer therapy. **Science & Medicine**, v. 3, n. 1, p. 32-41, 1996.

PARK, I. S.; OH, H. S.; KOO, J. G. Effect of oral tamoxifen on growth and survival in the bagrid catfish *Pseudobagrus fulvidraco*. **Aquaculture Research**, v. 34, n. 15, p. 1471-1474, 2003.

PHELPS, R. P.; POPMA, T. J. Sex reversal of tilapia In: COSTA PIERCE, B. A.; RAKOCY, J. E. (Ed.). **Tilapia aquaculture in the Americas**. Louisiana: World Aquaculture Society, 2000. v. 2, p. 34-59.

PIEAU, C.; DORIZZI, M. Oestrogens and temperature dependent sex determination in reptiles: all is in the gonads. **Journal of Endocrinology**, v. 181, n. 3, p. 367-377, 2004.

PIFERRER, F. Endocrine sex control strategies for the feminization of teleost fish. **Aquaculture**, v. 197, n. 1-4, p. 229-281, 2001.

PIFERRER, F.; GUIGUEN, Y. Fish gonadogenesis. Part 2. Molecular biology and Genomics of fish sex differentiation. **Reviews Fisheries Science**, v. 16, n. 1, p. 33-53, 2008.

POPMA, T. J. **Freshwater fish culture development project, ESPOL, Guayaquil, Ecuador**: final technical report. Auburn: Auburn University, 1987.

POPMA, T. J.; GREEN, B. W. **Sex reversal of tilapia in earthen ponds**: aquaculture production manual. Alabama: Auburn University, 1990. (Research and development series, 35).

POPMA, T. J.; LOVSHIN, L. **Worldwide prospects for commercial production of tilapia**. Auburn: Auburn University, 1996. (Research and development, 41).

SHARPE, R. L.; MACLATCHY, D. L.; COURTENAY, S. C.; VAN DER KRAAK, G. J. Effects of a model androgen (methyltestosterone) and a model anti-androgen (cyproterone acetate) on reproductive endocrine endpoints in short-term adult mummichog (*Fundulus heteroclitus*). **Aquatic Toxicology**, v. 67, n. 3, p. 203-215, 2004.

SMITH, C. A.; SINCLAR, A. H. Sex determination: insights from the chicken. **BioEssays**, v. 26, n. 2, p. 120-132, 2004.

SOCORRO, S.; POWER, D. M.; OLSSON, P. E.; CANARIO, A. V. M. Two estrogen receptors expressed in the teleost fish, *Sparus aurata*: cDNA cloning, characterization and tissue distribution. **Journal Endocrinology**, v. 166, n. 2, p. 293-306, 2000.

VOLPATO, G. L.; FRIOLI, P. M. A.; CARRIERI, M. P. Heterogeneous growth in fish: some data in the Nile tilapia *Oreochromis niloticus* and a general view about the casual mechanisms. **Boletim de Fisiologia Animal**, v. 13, p. 7-22, 1989.

XIA, Z.; PATIÑO R.; GALE, W. L.; MAULE, A. G.; DENSMORE, L. D. Cloning, in vitro expression, and novel phylogenetic classification of a channel catfish estrogen receptor. **General and Comparative Endocrinology**, v. 113, n. 3, p. 360-368, 1999.

XIA, Z.; GALE, W. L.; CHANG, X.; LANGENAU, D.; PATIÑO, R.; MAULE, A. G.; DENSMORE, L. D. Phylogenetic sequence analysis, recombinant expression, and tissue distribution of a channel catfish estrogen receptor β . **General and Comparative Endocrinology**, v. 118, n. 1, p. 139-149, 2000.

ZANARDI, M. F.; DIAS KOBERSTEIN, T. C. R.; URBINATI, E. C.; FAGUNDES, M.; DOS SANTOS, M. A.; MATAQUEIRO, M. I. Concentrações de hormônio na carcaça de tilápias-do-nilo e maturação precoce após reversão sexual. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 1, p. 7-11, 2011.

IV – Efeito de diferentes temperaturas na inversão sexual de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*)

RESUMO. Atualmente, o cultivo de tilápia depende da produção de populações de machos monossexo, obtidas com esteroides. Este experimento avaliou os efeitos da temperatura 28, 30, 32 e 34°C e do controle (28°C + ração acrescida de 60 mg kg⁻¹ de 17 α -metiltestosterona) na inversão sexual, sobrevivência e presença de deformidades na tilápia do Nilo. Os resultados demonstraram diferença estatística entre a proporção de machos, sendo que a temperatura de 32 e 34°C e controle ($91 \pm 0,71$; $96 \pm 0,59$ e $98 \pm 1,0\%$, respectivamente) apresentaram resultados superiores aos obtidos para os tratamentos 28 e 30°C ($71 \pm 0,29$ e $82 \pm 0,33\%$). A sobrevivência: $90,49 \pm 2,32$; $88,20 \pm 2,04$; $85,43 \pm 1,58$; $82,16 \pm 1,63$ e $90,74 \pm 2,28\%$ para as temperaturas 28, 30, 32 e 34°C, respectivamente, não apresentou diferenças estatísticas, mas houve diferenças na sobrevivência entre o controle e os tratamentos 32 e 34°C. Na análise das radiografias não foi possível observar presença de alterações morfológicas nos peixes submetidos aos diferentes tratamentos. Com esse experimento, concluiu-se que as temperaturas de 32 e 34°C foram capazes de masculinizar larvas geneticamente fêmeas, e que não houve incremento na mortalidade e na presença de deformidades que possam ser atribuídas aos tratamentos. Essa técnica é uma alternativa para a utilização de hormônios esteroides.

Palavras-chave: sobrevivência, alterações morfológicas.

Evaluation of different temperatures on sexual inversion of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)

ABSTRACT. Currently the cultivation of tilapia production depends on the population of males monosex obtained with steroids. This experiment evaluated the effects of temperatures 28, 30, 32 and 34°C and control (28°C + diet plus 60 mg of 17 α -methyltestosterone) on sexual inversion, survival and deformities presence in Nile tilapia. The results showed a statistical difference between the proportion of males, with temperatures of 32 and 34°C and control (91 ± 0.71 ; $96, \pm 0.59$ and $98.33 \pm 1.0\%$, respectively) showed better results than those obtained for treatments 28 and 30°C (71 and $82 \pm 0.29 \pm 0.33\%$). Survival: 90.49 ± 2.32 , 88.20 ± 2.04 , 85.43 ± 1.58 , 82.16 ± 1.63 and $90.74 \pm 2.28\%$ for temperatures 28, 30, 32 and 34°C, respectively, showed no statistical differences, but there were differences in survival between the control and

treatments 32 and 34°C. In the analysis of radiographs was not possible to observe the presence of morphological changes in fish subjected to different treatments. With this experiment it was concluded that at temperatures of 32 and 34°C larvae were able to genetically masculinize females, and that there was no increase in mortality and in the deformities presence that can be attributed to treatment. This technique is an alternative to the use of steroid hormones.

Keywords: survival, morphological changes.

Introdução

O cultivo de peixes em tanques e viveiros vem tornando-se uma atividade econômica de grande importância para a produção de proteína animal. A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), depois das carpas, é a espécie de água doce mais utilizada nos cultivos comerciais, principalmente por sua rusticidade, rápido crescimento, carne de ótima qualidade e boa aceitação pelo mercado de lazer (pesque-pague), e alimentício (frigoríficos) pelas qualidades nutritivas e organolépticas do seu filé (MEURER et al., 2000; MEURER et al., 2002; MEURER et al., 2003; BORGES et al., 2005).

Por outro lado, as características reprodutivas da tilápia do Nilo, como alta capacidade de reprodução, maturidade sexual precoce, fecundidade relativamente elevada e desova frequente, têm gerado um dos principais problemas encontrados pelos criadores de tilápias, que é a superpopulação dentro dos viveiros de cultivo, prejudicando a taxa de crescimento dos indivíduos (POPMA; GREEN, 1990; BORGES, 2002).

O cultivo racional da tilápia tem como uma das suas prioridades, a inversão sexual de fêmeas genéticas para machos fenotípicos os quais possuem crescimento mais rápido, e também evita problemas provenientes da reprodução e seus gastos energéticos (MEURER et al., 2005). O método mais comum para a criação de populações monossexo é a inversão sexual de larvas com a utilização de rações contendo hormônios esteroides sexuais sintéticos (POPMA; GREEN, 1990). Entre os hormônios pesquisados, o andrógeno sintético 17 α -metiltestosterona tem sido bastante empregado no processo de reversão sexual, por apresentar a vantagem de ser facilmente excretado logo após o período do tratamento hormonal (POPMA; GREEN, 1990; ROTHBARD et al., 1990; CURTIS et al., 1991; PHELPS; POPMA, 2000).

A influência da temperatura na inversão do sexo de peixes foi inicialmente demonstrada em estudos sobre o peixe rei *Menidia menidia*, por Conover e Kynard (1981) que demonstraram um período termossensível durante a ontogênese. Estudos mais recentes (BARAS et al., 2000; WANG; TSAI, 2000; BARAS et al., 2001; BARAS et al., 2002; KARAYÜCEL et al., 2003; BORGES, 2005; BEZAULT et al., 2007; WESSELS; HÖRSTGEN-SCHWARK, 2007; AZAZA et al., 2008; ANGIENDA, et al., 2010; WESSELS et al., 2011) confirmam essa característica em diferentes espécies de tilápia, que apresentam desvios significativos na proporção de fenótipos masculinos quando submetidos a temperaturas altas na fase inicial de desenvolvimento, quando o sexo fenotípico do indivíduo ainda não se desenvolveu. Este experimento buscou avaliar a influência da temperatura no percentual de machos, sobrevivência e presença de deformidade, de larvas de tilápia do Nilo (*O. niloticus*) mantidas durante o período de diferenciação sexual em temperaturas de 28, 30, 32 e 34°C.

Material e métodos

O experimento foi realizado no Laboratório da Estação de Piscicultura da Universidade Estadual de Londrina (Epuel), no período de 05 de abril a 03 de maio de 2011 (duração: 28 dias). As larvas de tilápia da variedade Supreme, com 48h pós-eclosão, utilizadas nesse experimento, foram obtidas junto à empresa Aquabel (Rolândia, Estado do Paraná). As 1.200 larvas transportadas em saco plástico foram distribuídas em 30 grupos de 40 indivíduos escolhidos ao acaso. Cada grupo foi transferido para uma unidade experimental, preparada com a utilização de garrafas pets com volume de 2 L, que tiveram o fundo retirado para facilitar o manejo alimentar; a tampa foi substituída por um pedaço de tela plástica “mosquiteiro” e a região mediana foi perfurada para facilitar a troca de água com o meio externo.

De um total de 30 unidades experimentais, 24 foram montadas no interior de quatro incubadoras do tipo Woynarovich de 220 L (6 unidades experimentais/incubadora). Após um período de adaptação de 24h, à temperatura das incubadoras foram acrescidas em 2°C a cada dia, com a ajuda de aquecedores e termostatos elétricos, até atingir as temperaturas propostas para o experimento que foram 28, 30, 32 e 34°C, a ração oferecida para a larvas nesses tratamentos continha 48% de proteína bruta. Uma quinta incubadora de 220 L, foi utilizada como controle onde seis unidades experimentais foram mantidas à temperatura de 28°C recebendo

dieta com 60 mg de 17 α -metiltestosterona por quilograma de ração com 48% de proteína bruta. A renovação de água nas incubadoras utilizadas no experimento foi constante e ajustada à manutenção da temperatura proposta em cada uma.

O crescimento das larvas durante o experimento foi avaliado por meio de biometrias. Na fase inicial, uma amostra de 15 indivíduos foi retirada ao acaso antes das larvas serem distribuídas nas unidades experimentais. Outras amostras de cinco indivíduos de cada repetição foram tomadas a cada 14 dias (14 e 28 dias). Nas três coletas, os animais foram insensibilizados com benzocaina (3 g 100 mL⁻¹ de álcool), sacrificados em álcool 70, e armazenados em frascos de vidro identificados por tratamento. Posteriormente, as larvas foram então medidas com o auxílio de um paquímetro digital, secas em papel toalha e pesadas em balança analítica, a média dos pesos obtidos em cada biometria foi utilizada para calcular a curva de ganho em peso. Para o cálculo de sobrevivência, as larvas sacrificadas durante as biometrias não foram consideradas.

Após o 28^o dia de tratamento a etapa de inversão sexual foi encerrada e as larvas transferidas para caixas d'água plásticas de 500 L. A temperatura, durante essa fase, foi mantida em 27°C com o auxílio de um aquecedor elétrico. O manejo alimentar foi realizado duas vezes ao dia, oferecendo-se ração comercial com 28% de proteína bruta, até a saciação. A renovação da água foi constante e a cada dois dias foi realizada a sifonagem dos restos de alimento e fezes. Após 60 dias de cultivo, dez indivíduos de cada repetição foram retirados aleatoriamente, anestesiados com o auxílio de benzocaína, sacrificados em solução bouin e armazenados em vidros identificados.

Para a análise da porcentagem de inversão sexual, os alevinos tiveram sua cavidade abdominal aberta com o auxílio de tesoura e pinça. As suas gônadas foram retiradas e transferidas para uma lâmina, onde foram coradas com acetato-carmim, prensadas com o auxílio de uma lamínula (Squash) e avaliadas em microscopia óptica em aumento de 40 vezes.

Para a avaliação de possíveis alterações morfológicas, uma segunda amostra de dez indivíduos de cada tratamento foi sacrificada, medida com auxílio de paquímetro digital e examinadas por meio de radiografias (adaptado de ALMEIDA, 2003) em equipamento radiológico General Electric[®] modelo 1000 utilizando-se filmes Kodak[®] com área de 18X24 cm, a distância focal foi de 60 cm e o equipamento calibrado em 10 mA e 45 KV, os peixes foram distribuídos sobre o chassi radiológico na posição lateral. Para a avaliação do desvio de coluna, duas linhas foram traçadas sobre a imagem da

radiografia; uma ligando a parte inicial da coluna vertebral (próximo à cabeça) à parte final da coluna e a segunda ligando a extremidade posterior da primeira linha ao ponto mais distante da curvatura da coluna. Os animais foram considerados como portador de desvio na coluna vertebral em que o ângulo formado entre as duas linhas foi superior a 15°. Também foi observado se houve a presença de alterações na forma dos ossos da cabeça e opérculo.

A qualidade de água foi avaliada semanalmente para as seguintes variáveis: pH (potenciômetro digital), oxigênio dissolvido (mg L^{-1}) (oxímetro YSI - *Yellow Spring Instruments*), alcalinidade CaCO_3 (mg L^{-1}) e amônia (mg L^{-1}), utilizando a metodologia de Golterman et al. (1978).

Os dados obtidos de sobrevivência e porcentagem de machos por apresentarem a caracterização binária, em que se verifica a sobrevivência ou a morte e a ocorrência de machos ou fêmeas, foram submetidas a análises estatísticas utilizando a metodologia de modelos lineares generalizados, implementado no PROC GENMOD do sistema computacional SAS. Para ambas as variáveis, considerou-se a distribuição binomial com função ligação logit. Ajustou-se uma regressão logística da porcentagem de sobrevivência e ocorrência de machos em função das diferentes temperaturas de cultivo. Comparou-se o tratamento controle (de 28°C recebendo dieta com 60 mg de 17 α -metiltestosterona por quilograma de ração) com aqueles em que variou as temperaturas.

Para avaliar o ganho em peso dos animais submetidos aos diferentes tratamentos nesse experimento, os resultados de peso final obtidos na última biometria foram submetidos ao teste de análise de variância.

Resultados e discussão

Os resultados obtidos das variáveis físicas e químicas da água, no interior das unidades experimentais foram: oxigênio dissolvido (mg L^{-1}): $4,4 \pm 0,8$; pH: $6,8 \pm 0,2$; alcalinidade total: 60 mg L^{-1} e amônia total: $< 0,5 \text{ ppm}$. A temperatura manteve-se dentro das faixas propostas para os tratamentos 28, controle (28 + 60 mg de 17 α -metiltestosterona), 30, 32 e 34°C e os valores médios foram de $28,06 \pm 0,24$; $28,10 \pm 0,28$; $30,60 \pm 2,33$; $32 \pm 0,61$ e $34,44 \pm 0,26$, respectivamente. Os resultados de oxigênio dissolvido, pH, alcalinidade total e amônia total observados nesse experimento encontram-se dentro da faixa do recomendada por Boyd (1990) e Popma e Lovshin (1996), contudo a temperatura, nos tratamentos com 30, 32 e 34°C, é considerada acima

da recomendada pelos autores, o que pode influenciar a qualidade do cultivo e na sobrevivência das larvas.

As curvas de ganho em peso podem ser observadas na Figura 1, as quais se comportam de modo similar nos diferentes tratamentos durante o experimento. As médias finais, obtidas na última biometria, de peso final para os tratamentos 28, controle, 30, 32 e 34°C foram, respectivamente, $0,109 \pm 0,029$; $0,1344 \pm 0,0456$; $0,1024 \pm 0,0357$; $0,0912 \pm 0,0291$ e $0,1138 \pm 0,0697$, e a análise estatística dos resultados demonstraram não haver diferenças entre os pesos obtidos na última biometria. Esses resultados diferem dos obtidos por Baras et al. (2001) que afirmaram que a exposição de larvas de tilápia do Nilo a temperaturas masculinizantes, pode diminuir significativamente as taxas de crescimento quando comparadas com temperaturas normais de cultivo. Essa redução de crescimento é explicada por Schimittou (1993) ao afirmar que peixes como a tilápia do Nilo reduzem o consumo ou mesmo cessam a alimentação com a variação da temperatura da água para além da sua faixa ideal.

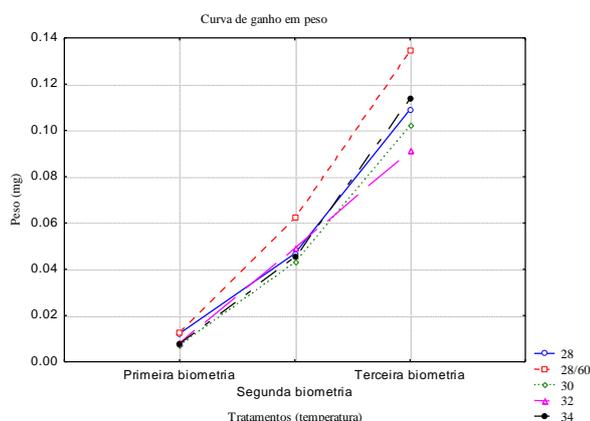


Figura 1. Curva de ganho em peso das larvas de tilápia do Nilo mantidas em diferentes temperaturas: 28, 30, 32 e 34°C e alimentadas com ração contendo 60 mg kg^{-1} de 17α -metiltestosterona, por um período de 28 dias.

Os dados de ganho em peso ao serem analisados demonstraram não haver diferença estatística significativa. Esses resultados, no entanto, são diferentes dos obtidos por Dias-Koberstein et al. (2007) que observaram diferenças significativas no ganho em peso de larvas alimentadas com dietas contendo 17α -metiltestosterona. Segundo Rinchar et al. (1999), o efeito anabólico deste esteroide é dependente de

vários fatores, como estágio de desenvolvimento, tempo de administração do hormônio, método de aplicação, temperatura e fatores dietéticos.

Os resultados médios de porcentagem de indivíduos machos dentro de cada tratamento em que se testaram diferentes temperaturas 28, 30, 32, 34°C foram, respectivamente, $71 \pm 0,29$; $82 \pm 0,33$; $91 \pm 0,71$ e $96 \pm 0,59\%$, e o controle resultou em $98,33 \pm 1,0\%$ de indivíduos machos. A análise de regressão logística indicou que com o aumento da temperatura houve aumento na porcentagem de machos (Figura 2). A comparação das médias obtidas pela análise estatística demonstrou não haver diferença significativa entre os tratamentos 28 e 30°C e entre os tratamentos 32 e 34°C, no entanto quando as médias dos tratamentos 28 e 30 foram comparadas com os 32, 34 e controle + 17 α -metiltestosterona, há diferença estatística significativa ($p < 0,05$).

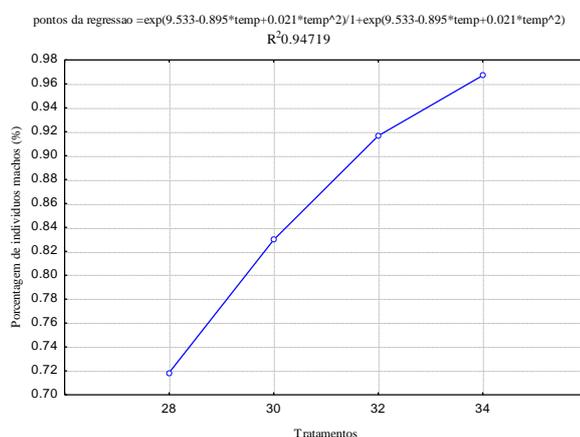


Figura 2. Reta e equação da regressão linear da inversão sexual de alevinos de tilápia do Nilo induzidos por diferentes temperaturas.

Os resultados obtidos com a tilápia do Nilo variedade Supreme demonstram haver um comportamento quadrático ($P < 0,05$) entre o maior número de indivíduos machos e o aumento da temperatura, com nível para melhor desempenho em temperatura de 32 e 34°C, confirmando os resultados já obtidos por diversos autores em estudos prévios para outras linhagens de tilápia do Nilo (BAROILLER et al., 1995; LIKONGWE et al., 1996; ABUCAY et al., 1999; BARAS et al., 2001; KARAYÜCEL et al., 2003; BORGES, 2005; BEZAULT et al., 2007; WESSELS; HÖRSTGENSCHWARK, 2007; AZAZA et al., 2008; ROUGEOT et al., 2008; ANGIENDA et al., 2010; WESSELS et al., 2011), bem como para outras espécies de tilápias (DESPREZ; MÉLARD, 1998; BARAS et al., 2000; WANG; TSAI, 2000; BARAS et al., 2002).

O aumento na proporção de indivíduos machos, observado em tilápia do Nilo submetidas à temperatura alta, segundo Abucay et al. (1999), deve-se provavelmente a um efeito sobre a estrutura ou a ação de um ou mais hormônios que agem na diferenciação sexual. Wang e Tsai (2000) afirmaram que a determinação do sexo em peixes é baseada na concorrência entre a 5 α -reductase e a P450 aromatase pelo substrato andrógeno no cérebro e nas gônadas indiferenciadas, sendo que as temperaturas que determinam o sexo feminino podem promover aumento na produção de receptores de aromatase e/ou estrogênio que, por sua vez, promovem o desenvolvimento do sexo feminino. Por outro lado, a determinação do sexo masculino pela temperatura, deve-se ao aumento na produção de reductase e/ou receptor de andrógeno.

Algumas variedades de tilápia, segundo Abucay et al. (1999) e Baras et al. (2001), são mais susceptíveis aos efeitos da temperatura na proporção de macho, do que outras variedades. Esses autores relataram resultados em que a razão sexual de progênies, de diferentes reprodutores, criados em 35°C variou entre 51 a 90%. Resultados semelhantes também foram encontrados por Baroiller et al. (1995) ao relatar que reprodutores da mesma variedade poderiam resultar em progênies que seriam pouco ou muito pouco sensíveis à temperatura. Essa discrepância entre os resultados obtidos dentro de uma mesma variedade de tilápias, segundo Baras et al. (2001), pode ser atribuída à heterogeneidade das linhagens avaliadas, sendo que quanto maior heterose, maior a variação na proporção dos sexos.

Neste experimento, as porcentagens de macho obtidos nos diferentes tratamentos não foram discrepantes, demonstrado haver baixo grau de heterose. Esta afirmação é comprovada por Baroiller et al. (1995) que indicam as linhagens Chitralada e a Boauké, como possuindo maior sensibilidade aos tratamentos com temperatura. Borges et al. (2005) postularam que essas duas linhagens representam as melhores opções para o desenvolvimento da tecnologia de produção de populações monossexo macho por meio da temperatura.

Os valores médios de sobrevivência foram $90,49 \pm 2,32$; $88,20 \pm 2,04$; $85,43 \pm 1,58$ e $82,16 \pm 1,63\%$ para os tratamentos 28, 30, 32 e 34, respectivamente, e $90,74 \pm 2,28\%$ para o controle. Em estudo realizado por Rougeot et al. (2008), os autores observaram que a temperatura acima de 35°C, durante o período de diferenciação sexual das larvas de tilápia do Nilo, diminuiu drasticamente as taxas de sobrevivência dos alevinos. No presente experimento, a maior temperatura foi 34°C e a taxa de

sobrevivência não apresentou diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos com temperatura 28, 30, 32 e 34°C, mas houve diferença entre o controle e os tratamentos 32 e 34°C. Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Desprez e Mélard (1998), que também obtiveram taxas de sobrevivência semelhantes de larvas de tilápia azul (*O. aureus*), mantidas em temperaturas de 34 e 27°C (controle). Wessels et al. (2011) afirmam que larvas com mais de 15h pós-fertilização são mais resistentes ao processo de inversão sexual utilizando temperaturas altas, do que larvas com menos de 12h pós-fertilização. Essa afirmação contribui para esclarecer a ausência de diferença estatística na sobrevivência das larvas submetidas às temperaturas de 28, 30, 32 e 34°C neste experimento, uma vez que as larvas utilizadas apresentavam mais de 48h de vida quando foram submetidas a temperaturas mais elevadas.

As radiografias dos alevinos de tilápia do Nilo submetidas aos diferentes tratamentos de temperatura mediram $51,8 \pm 11,6$ mm, e neste experimento não apresentaram deformidades estruturais na coluna vertebral, costelas, ossos do crânio, mandíbula, maxila e opérculos (Figura 3).

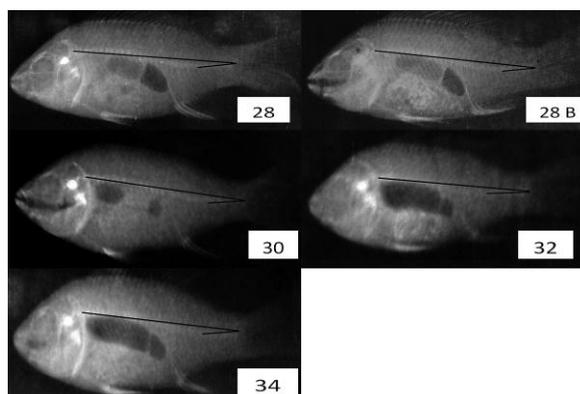


Figura 3. Radiografias de alevinos de tilápia, medindo $51,8 \pm 11,6$ mm submetidos aos diferentes tratamentos nas temperaturas 28, 30, 32, 34°C e do controle (28B).

Em experimento realizado por Wang e Tsai (2000), foi observado que quando larvas de tilápia (*O. mossambicus*) com zero a cinco dias de idades foram expostas a temperaturas entre 28 a 32°C, houve aumento na proporção de indivíduos que apresentam deformidades, enquanto que temperaturas em torno de 20°C não teve influência nessa proporção. Graham e Hop (1995) também encontraram maior número de deformidades em larvas de bacalhau quando foram expostas a temperaturas mais altas. Wang e Tsai (2000) também afirmaram que os mecanismos pelos quais

temperaturas elevadas induzem à deformidade de teleósteos ainda não é clara e precisa ser mais investigada.

Conclusão

Este experimento permitiu concluir que as temperaturas de 32 e 34°C foram eficientes em promover a inversão sexual de larvas de tilápia do Nilo, variedade Supreme, sem provocar alterações morfológicas, sugerindo que a temperatura pode ser uma alternativa para a substituição do hormônio 17 α -metiltestosterona, utilizado durante o processo de inversão sexual.

Referências

ABUCAY, J. S. C.; MAIR, G. C.; SKIBINSKI, D. O. F.; BEARDMORE, J. A. Environmental sex determination: the effect of temperature and salinity on sex ratio in *Oreochromis niloticus* L. **Aquaculture**, v. 173, n. 1-4, p. 219-234, 1999.

ALMEIDA, G. S. C. **Suplementação dietética de vitamina c, desenvolvimento e sanidade do pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887)**. 2003. 47 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia)- Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

ANGIENDA, P. O.; AKETCH, B. O.; WAINDI, E. N. Development of All-male Fingerlings by Heat Treatment and the Genetic Mechanism of Heat Induced Sex Determination in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). **International Journal of Biological and Life Sciences**, v 6, n. 1, p. 38-43, 2010.

AZAZA, M. S.; DHRAÏEF, M. N.; KRAÏEM M. M. Effects of water temperature on growth and sex ratio of juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus) reared in geothermal waters in southern Tunisia. **Journal of Thermal Biology**, v. 33, n. 2, p. 98-105, 2008.

BARAS, E.; PRIGNON, C.; GOHOUNGO, G.; MÉLARD, C. Phenotypic sex differentiation of blue tilapia under constant and fluctuating thermal regimes and its adaptive and evolutionary implications. **Journal of Fish Biology**, v. 57, n. 1, p. 210-223, 2000.

BARAS, E.; JACOBS, B.; MÉLARD, C. Effects of water temperature on survival, growth and phenotypic sex of mixed (XX – XY) progenies of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture**, v. 192, n. 2-4, p. 187-199, 2001.

BARAS, E.; MPO'N'TCHA, A.; DRIOUCH, H.; PRIGNON, C.; MÉLARD, C. Ontogenic variations of thermal optimum for growth, and its implication on thermolabile sex determination in blue tilapia. **Journal of Fish Biology**, v. 61, n. 3, p. 645-660, 2002.

BAROILLER, J. F.; CHOURROUT, D.; FOSTIER, A.; JALABERT, B. Temperature and sex chromosomes govern the sex ratios of the mouthbreeding cichlid fish *Oreochromis niloticus*. **Journal of Experimental Zoology**, v. 273, n. 3, p. 216-223, 1995.

BEZAULT, E.; FRÉDÉRIC CLOTA, F.; DERIVAZ, M.; CHEVASSUS, B.; BAROILLER, J. F. Sex determination and temperature-induced sex differentiation in three natural populations of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) adapted to extreme temperature conditions. **Aquaculture**, v. 272, n. 1, p. S3-S16, 2007. Suplemento.

BORGES, A. M. **Piscicultura**. 2. ed. Brasília, DF: Emater, 2002.

BORGES, A. M.; MORETTI, J. O. C.; MCMANUS, C.; MARIANTE, A. S. Produção de populações monossexo macho de tilápia-do-nilo da linhagem Chitralada. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 40, n. 2, p. 153-159, 2005.

BOYD, C. **Water quality in ponds for aquaculture**. London: Birmingham, 1990.

CONOVER, D. O.; KYNARD, B. E. Environmental sex determination: interaction of temperature and genotype in a fish. **Science**, v. 213, p.577-579, 1981.

CURTIS, L. R.; DIREN, F. T.; HURLEY, M. D.; SEIM, W. K.; TUBB, R. A. Disposition and elimination of α methyltestosterone in Nile tilapia, **Aquaculture**, v. 99, n. 1-2, p. 193-201, 1991.

DESPREZ, D.; MÉLARD, C. Effect of ambient water temperature on sex determinism in the blue tilapia *Oreochromis aureus*. **Aquaculture**, v. 162, n. 1, p. 1-2, 1998.

DIAS-KOBERSTEIN, T. C. R.; NETO, A. G.; STÉFANI, M. V.; MALHEIROS, E. B.; ZANARDI, M. F.; SANTOS, M. A. Reversão sexual de larvas de tilapia do nilo (*oreochromis niloticus*) por meio de banhos de imersão em diferentes dosagens hormonais. **Revista. Academica**, v. 5, n. 4, p. 391-395, 2007.

GOLTERMAN, H. L.; CLYMO, R. S; OHNSTAD, M. A. M. **Methodos for physical and chemical analisys of fresh water**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1978.

GRAHAM, M.; HOP, H. Aspects of reproduction and larval biology of arctic cod (*Boreogadus saida*). **Arctic**, v. 48, p. 130-135, 1995.

KARAYÜCEL, I.; PENMAN, D.; KARAYÜCEL, S.; McANDREW, B. Thermal and hormonal feminization of all male YY Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. **The Israeli Journal of Aquaculture – Bamidgeh**, v. 55, n. 2, p. 114-122, 2003.

LIKONGWE, J. S. L.; STECKO, T. D.; JAY, R.; STAUFFER, J. R.; CARLINE, R. F. Combined effects of water temperature and salinity on growth and feed utilization of juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Linnaeus) **Aquaculture**, v. 146, n. 1, p. 37-46, 1996.

MEURER, F.; HAYASHI, C.; SOARES, C. M. Utilização de levedura spray dried na alimentação de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* L.), **Acta Scientiarum**, v. 22, n. 4, p. 479-484, 2000.

MEURER, F.; HAYASHI, C.; BOSCOLO, W. R. Lipídeos na alimentação de alevinos revertidos de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus*, L.). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 2, p. 566-573, 2002.

MEURER, F.; HAYASHI, C.; BOSCOLO, W. R. Influência do processamento da ração no desempenho e sobrevivência da tilápia-do-nilo durante a reversão sexual. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 2, p. 262-267, 2003.

MEURER, F.; HAYASHI, C.; BOSCOLO, W. R.; SCHAMBER, C. R.; BOMBARDELLI, R. A. Fontes protéicas suplementadas com aminoácidos e minerais para tilápia do Nilo durante a reversão sexual, **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 1, p. 1-6, 2005.

PHELPS, R. P.; POPMA, T. J. Sex reversal of tilapia In: COSTA PIERCE, B. A.; RAKOCY, J. E. **Tilapia aquaculture in the Americas**. Louisiana: World Aquaculture Society, 2000. v. 2, p. 34-59.

POPMA, T. J.; GREEN, B. W. **Sex reversal of tilapia in earthen ponds: aquaculture production manual**. Alabama: Auburn University, 1990. (Research and development series, 35).

POPMA, T. J.; LOVSHIN, L. **Worldwide prospects for commercial production of tilapia**. Auburn: Auburn University, 1996. (Research and development, 41).

RINCHARD, J.; DABROWSKI, K.; GARCIA-ABIADO, M. A.; OTTOBRE, J. Uptake and depletion of plasma 17- α -methyltestosterone during induction of masculinization in muskellunge, *Esox masquinongy*: Effect on plasma steroids and sex-reversal. **Steroids**, v. 64, n. 8, p. 518-525, 1999.

ROTHBARD, S.; ZOHAR, Y.; ZMORA, N.; SIVAN, B. L.; MOAV, B.; YARON, Z. Clearance of 17 α -methyltestosterone from muscle of sex-inversed tilapia hybrids treated for growth enhancement with two doses of the androgen, **Aquaculture**, v. 89, n. 3-4, p. 365-376, 1990.

ROUGEOT, C.; KANFITINE, S. Y.; PRIGNON, C.; GENNOTTE, V.; MÉLARD, C. Early sex reversal during the embryonic development in the Nile tilapia. **Cybium**, v. 32, n. 2, p. 104-105, 2008. Suplemento.

SCHMITTOU, H. R. **High density fish culture in low volume cages**. Singapore: American Soybean Association, 1993.

WANG, L. H.; TSAI, C. L. Effects of temperature on the deformity and sex differentiation of tilapia, *Oreochromis mossambicus*. **Journal of Experimental Zoology**, v. 286, n. 5, p. 534-537, 2000.

WESSELS, S.; HÖRSTGEN-SCHWARK, G. Selection experiments to increase the proportion of males in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by means of temperature treatment. **Aquaculture**, v. 272, n. 1, S80–S87, 2007. Suplemento.

WESSELS, S.; SAMAVATI, S.; HÖRSTGEN-SCHWARK, G. Effect of early temperature treatments on sex differentiation in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* lines selected for high and low thermo-sensitivity. **Aquaculture**, v. 316, n. 1-4, p. 139-142, 2011.

V – Utilização de diferentes técnicas: citológica, estrutural e ultraestrutural na descrição de gônadas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)

RESUMO. Este estudo foi realizado com objetivo de descrever gônadas de alevinos de tilápia do Nilo (Supreme) com 75 dias de idade, utilizando como ferramenta as técnicas: citológica, estrutural e ultraestrutural. Na técnica citológica, as gônadas coradas com acetato carmim foram prensadas entre lâmina e lamínula e observadas em microscopia de luz. Para a preparação estrutural, as gônadas após processamento, foram cortadas em micrótomo na espessura de 5 μm , coradas com hematoxilina-eosina e observadas em microscopia de luz. No método ultraestrutural, gônadas foram fotodocumentadas em microscópio eletrônico de varredura FEI QUANTA 200. As preparações citológicas e estruturais dos ovários permitiram a visualização de ovócitos, seus limites celulares, os núcleos e nucléolos associados. Nos machos, a preparação citológica não permitiu a identificação clara das estruturas, mas na preparação estrutural dos testículos foi possível visualizar cistos espermáticos, células de sertoli e o início da formação de túbulos seminíferos. A microscopia eletrônica de varredura, utilizada para a visualização de superfície permitiu, após a fratura das gônadas, observar estruturas internas, tais como espermatogônias, ovócitos e fibras de colágeno. Os resultados obtidos demonstraram que as três técnicas foram eficientes na distinção do sexo do indivíduo, permitindo a observação e a comparação das estruturas presentes nas gônadas.

Palavras-chave: microscopia eletrônica; microscopia de luz; sexagem.

Use of different techniques: cytological, structural and ultra structural in the gonads description of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*)

ABSTRACT. This study intended to describe gonads of Nile tilapia fingerlings (Supreme) with 75 days of age, using as a tool cytological techniques, structural and ultrastructural. Cytological technique gonads were stained with carmine acetate pressed between slide and coverslip and observed under light microscopy. To structural prepare gonads, after processing, were cut in microtome at thickness of 5 μm , stained with hematoxylin-eosin and observed under light microscopy. At the ultrastructural method, gonads were photo documented in a scanning electron microscope FEI QUANTA 200. The structural and cytological preparations allowed the visualization of the ovaries of

oocytes, cell boundaries, nuclei and nucleoli associated. In males the cytologic preparations did not allow a clear identification of the structures, but in preparing structural testicular sperm was possible to visualize cysts, Sertoli cells and the beginning of the formation of seminiferous tubules. The scanning electron microscopy, used to visualize surface allowed, after the fracture of the gonads, to observe internal structure, such as spermatogonia, oocytes and collagen fibers. The results showed that all three techniques were efficient in distinguishing the sex of the individual, allowing observation and comparison of the structures present in the gonads.

Keywords: electron microscopy, light microscopy, sexing.

Introdução

O sucesso reprodutivo de animais adultos de qualquer espécie depende do desenvolvimento normal das gônadas que se inicia nos primeiros estágios de formação do embrião e envolve o processo de diferenciação sexual, que nos invertebrados inferiores é um processo muito instável de alta plasticidade fenotípica, sendo a determinação do sexo em peixes controlada principalmente por fatores genéticos, mas também fortemente influenciada por fatores ambientais (BLAZQUEZ et al., 1998, DEVLIN; NAGAHAMA, 2002; STRÜSSMANN; NAKAMURA, 2002).

A precocidade sexual é desejável na produção em escala de indivíduos jovens, contudo é um complicador para o cultivo da tilápia do Nilo, pois as fêmeas ainda jovens com peso próximo a 30 g podem iniciar sua vida reprodutiva (WASSERMANN; AFONSO, 2002). A capacidade reprodutiva acentuada e precoce é um dos principais entraves no processo de engorda e produção de indivíduos adultos para abate, justificando a adoção de técnicas de cultivo monossexo masculino (GALE et al., 1999; DAN; LITTLE, 2000). Segundo Wassermann e Afonso (2002), apesar do desenvolvimento e difusão de novas tecnologias de inversão sexual em peixes, ainda faltam meios eficazes na avaliação da qualidade destas novas técnicas.

A eficiência do processo de inversão sexual pode ser avaliada utilizando-se técnicas de preparação histológica das gônadas (CARVALHO; FORESTI, 1996; PALLER; GUERRERO III, 2001), ou por métodos citológicos, nos quais as gônadas coradas com acetato carmim são prensadas entre uma lâmina e uma lamínula. Esse método desenvolvido por Guerrero e Shelton (1974) foi validado para a tilápia do Nilo por Wassermann e Afonso (2002). Vários trabalhos foram realizados utilizando o

método de sexagem corando-se as gônadas das tilápias com acetato carmim (GUERRERO; SHELTON, 1974; WASSERMANN; AFONSO, 2002; BOMBARDELLI et al., 2004; TACHIBANA et al., 2004; NEUMANN, 2009), embora não tenham sido descritos os aspectos histológicos das gônadas e nem terem sido realizadas avaliações comparativas quanto à sua eficiência frente aos outros métodos testados.

Para compreensão dos processos de determinação do sexo, em peixes, são necessários estudos que expliquem o desenvolvimento de células e órgãos envolvidos na formação da gônada (YAMAMOTO, 1953; CHAN, YEUNG, 1983; NAKAMURA et al., 1998). Este experimento teve como objetivo descrever as gônadas masculinas e femininas da tilápia do Nilo, utilizando preparações citológicas e métodos estrutural e ultraestrutural, comparando os métodos quanto à eficiência na avaliação do sexo do indivíduo.

Material e métodos

Os alevinos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), utilizados nesse experimento, foram da variedade Supreme e proveniente da estação de piscicultura Aquabel (Rolândia, Estado do Paraná). As larvas recém-eclodidas foram transferidas para a Estação de Piscicultura da Universidade Estadual de Londrina, onde foram mantidas em uma incubadora do tipo calha, recebendo uma dieta contendo 28% de proteína bruta.

A qualidade de água foi avaliada semanalmente para as seguintes variáveis: pH (potenciômetro digital), oxigênio dissolvido (mg L^{-1}) e temperatura (oxímetro YSI - *Yellow Spring Instruments*), alcalinidade CaCO_3 (mg L^{-1}) e amônia (mg L^{-1}), utilizando a metodologia de Golterman et al. (1978).

Para a análise citológica das gônadas, uma amostra de dez indivíduos com 75 dias de idade foi sacrificada após insensibilização em um recipiente contendo 1 L de água, onde foram adicionados 5 mL de extrato alcoólico de cravo. Os peixes foram acondicionados em um frasco contendo solução de formol a 10% e após a fixação tiveram a cavidade abdominal aberta com o auxílio de tesoura e pinça. Sobre as gônadas foi adicionada uma gota do fixador Bouin para enrijecer o tecido e facilitar a retirada. Logo após, as mesmas foram transferidas para uma lâmina onde foram coradas com acetato carmim e prensadas levemente sob uma lamínula. A estrutura foi observada em

microscópio de luz comum, onde foram capturadas imagens por meio de uma câmera digital (MOTICAM, 3,0 megapixels).

Para a análise histológica, uma segunda amostra de peixes foi escolhida aleatoriamente dentro da população, os quais foram transferidos, um de cada vez, para um recipiente plástico contendo 1 L de água, onde foram insensibilizados conforme procedimento para a análise citológica. Os peixes tiveram sua cavidade abdominal aberta e uma gota de Bouin foi adicionada às gônadas, que foram dissecadas e transferidas para microtubos plásticos nos quais havia 1,0 mL de fixador (Bouin). Esse procedimento foi repetido até atingir o número de 12 indivíduos. Após 6h no fixador, as gônadas foram lavadas no interior dos microtubos plásticos, com seis banhos de 30 min. de água destilada e, após a lavagem, as gônadas passaram pelo processo de desidratação em uma série de etanol com concentrações crescentes e diafanizadas em xilol. A inclusão foi realizada em uma mistura de parafina purificada contendo polímeros plásticos (paraplast), e os cortes foram realizados em micrótomo na espessura de 5,0 μm , montados em lâminas de vidro, corados com hematoxilina-eosina (HE). A análise foi feita com o auxílio de um microscópio de luz e os melhores cortes foram fotomicrografados.

Para estudos de microscopia eletrônica de varredura, gônadas inteiras foram retiradas de cinco peixes também com 75 dias, escolhidos ao acaso e insensibilizados conforme os procedimentos anteriores. As gônadas foram retiradas com o auxílio de tesoura e pinça e fixadas por imersão em solução de Karnovsky modificada. Após a fixação, as gônadas foram transferidas para uma placa de Petri e, para expor a região interna, as gônadas foram cortadas em pequenos segmentos com o auxílio de uma lâmina de bisturi e de um microscópio estereoscópico. A desidratação foi realizada por uma série de etanol, iniciando em álcool 70% até chegar a álcool 100% e posteriormente obteve-se o ponto crítico com dióxido de carbono líquido. As amostras foram montadas em suporte, para serem metalizadas com uma mistura coloidal de ouro. O material foi analisado e fotodocumentado em microscópio eletrônico de varredura FEI QUANTA 200.

Resultados

Os resultados obtidos das variáveis físicas químicas da água, no presente experimento, foram: temperatura da água: $28 \pm 1,3^\circ\text{C}$; oxigênio dissolvido (mg L^{-1}): $4,3 \pm 0,7$; pH: $6,7 \pm 0,2$; alcalinidade total: 60 mg L^{-1} e amônia total: $< 0,5 \text{ ppm}$.

Os peixes sacrificados para a análise citológica apresentavam um par de gônadas filamentosas localizadas na cavidade celomática, dorsalmente ao tubo digestório, e ventrolateralmente ao longo da bexiga gasosa, estando presa à parede celomática e à bexiga natatória por uma prega do peritônio, estendendo-se desde a cabeça até a papila genital.

Nos machos, as gônadas, normalmente, apresentavam-se mais finas e transparentes enquanto que nas fêmeas as gônadas eram um pouco mais largas que nos machos, mas ainda filamentosas e apresentavam coloração esbranquiçada (opacas). A identificação entre machos e fêmeas, utilizando o método citológico, foi evidente, pois as gônadas femininas apresentavam-se bem definidas. A Figura 1 mostra o tecido ovárico em um microscópio de luz corada com acetato carmim, demonstrando a presença de ovócitos com seus núcleos evidentes e seus respectivos limites celulares, enquanto que na Figura 2, também coradas com acetato carmim, os testículos ainda indiferenciados apresentam gônias, mas não apresentam túbulos seminíferos distintos.

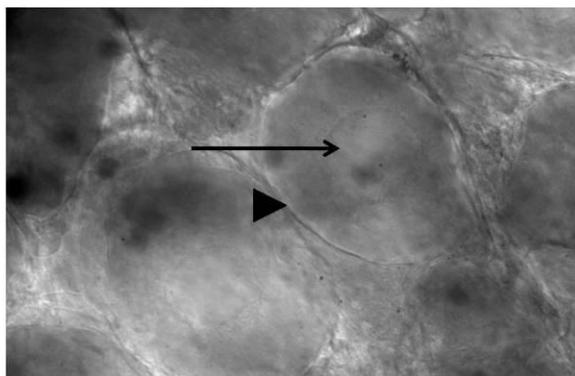


Figura 1. Fotomicrografia de ovário de tilápia do Nilo coradas com acetato carmim, é possível reconhecer os ovócitos com núcleos evidentes (seta) e seus limites celulares (cabeça de seta).

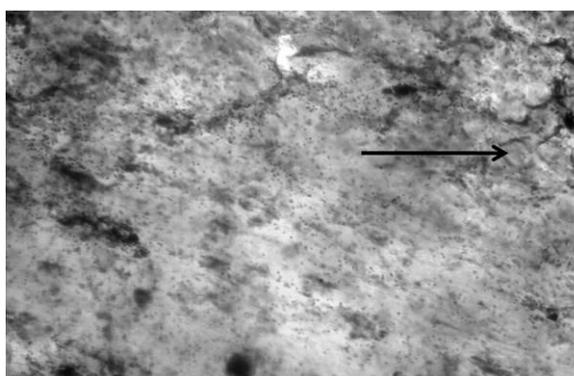
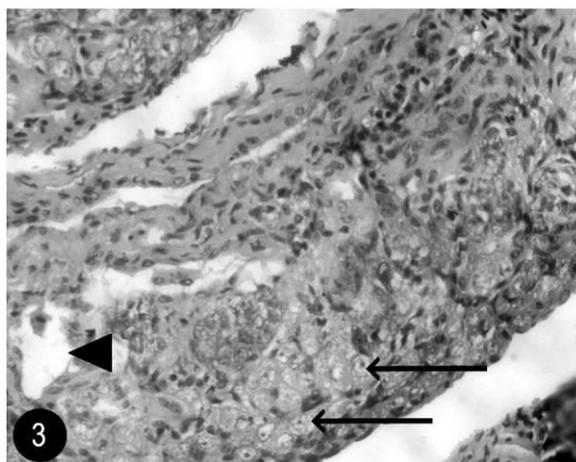
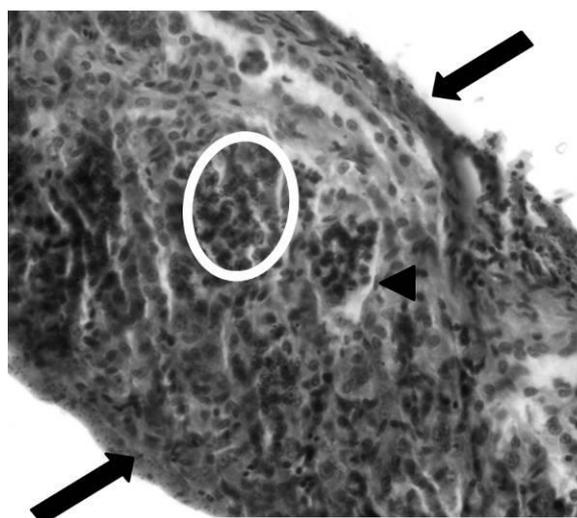


Figura 2. Fotomicrografia de gônadas masculinas em fase inicial de desenvolvimento testicular e com a presença de gônias (seta).

Os cortes histológicos, corados com HE, também foram eficientes na determinação sexual dos alevinos de tilápia do Nilo. Os testículos podem ser observados nas Figuras 3 e 4 que mostram as gônadas envolvidas por uma delgada cápsula de tecido conjuntivo e também o início da formação dos túbulos seminíferos, que apresentavam no seu interior cistos espermáticos repletos de espermatogônias com citoplasma que apresenta pouca afinidade pelos corantes HE.



Figuras 3. Fotomicrografia de cortes histológicos do órgão masculino corado com HE - presente a espermatogônia com citoplasma com pouca afinidade pelo corante HE (seta). A cabeça da seta indica um túbulo seminífero em fase inicial de desenvolvimento.



Figuras 4. Fotomicrografia de cortes histológicos do órgão masculino corado com HE, as setas largas apontam para a cápsula de tecido conjuntivo e o círculo branco destaca um cisto espermático repleto de espermatogônias. A cabeça de seta indica uma célula de Sertoli envolvendo células germinativas do cisto em destaque.

Os cortes histológicos dos ovários, corados com HE, podem ser observados nas Figuras 5 e 6 e apresentavam ovogônias e ovócitos em diferentes fases de maturação, sendo visível o núcleo imerso em citoplasma com forte basofilia e a presença de vários nucléolos associados à membrana nuclear.

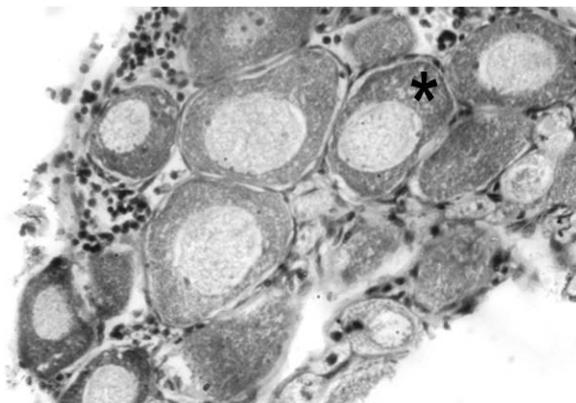


Figura 5. Corte histológico de gônadas femininas de *Oreochromis niloticus*, coradas pelo método de HE - presente as várias ovogônias em diferentes estádios de maturação. O asterisco destaca a presença de citoplasma basófilo presente no interior da ovogônia.

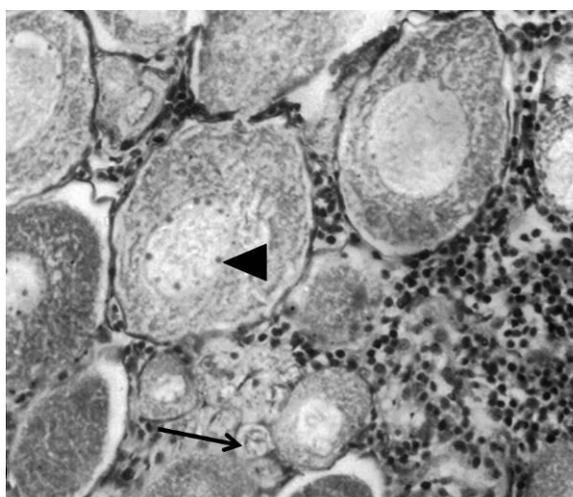


Figura 6. Corte histológico de gônadas femininas de *Oreochromis niloticus*, corada pelo método de HE a seta fina aponta o núcleo de uma gônia e a cabeça de seta um dos nucléolos presentes no núcleo.

Os resultados obtidos com a microscopia eletrônica de varredura podem ser observados nas Figuras 7 a 11, em que as gônadas inteiras apresentavam-se como estruturas delgadas e alongadas, que após o processamento, tornavam-se enoveladas (Figura 7). O epitélio de revestimento visto na Figura 8 envolve toda a gônada, não

permitindo a visualização de estruturas internas, as quais só se tornavam visíveis após a fragmentação das gônadas. As eletronicografias dos fragmentos demonstravam a presença nos testículos de uma rede frouxa de fibras de colágeno e a presença de células germinativas (Figura 9). Nos ovários, além de uma densa rede de fibras de colágeno (Figura 10) também se pode observar a presença de células da linhagem germinativa em diferentes estádios de maturação (Figura 11).



Figura 7. Eletronicografias de uma gônada inteira de tilápia do Nilo, que se apresenta enovelada, após a obtenção do ponto crítico.

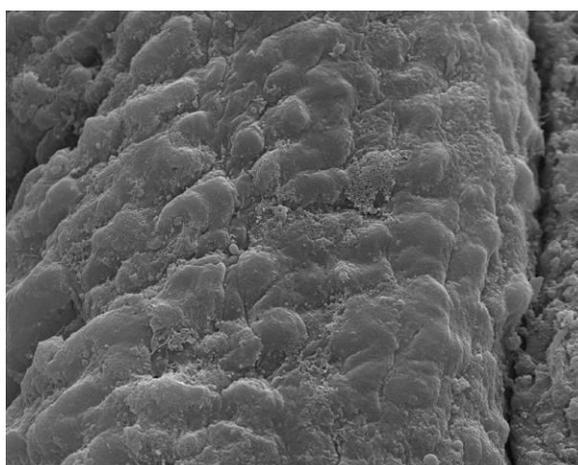


Figura 8. Eletronicografias do epitélio de revestimento de gônadas de tilápia do Nilo.

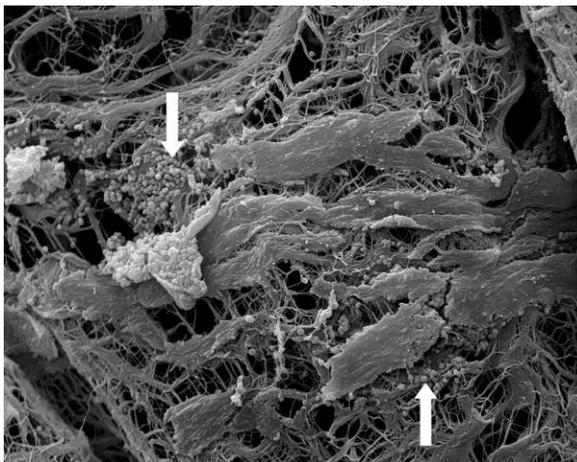


Figura 9. Eletronmicrografias de gônadas masculinas de tilápia do Nilo presente a rede frouxa de fibras de colágeno e presença de células germinativas (setas brancas).

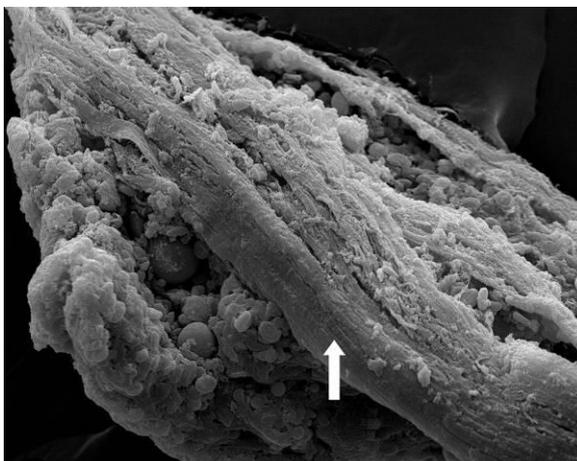


Figura 10. Eletronmicrografias de gônadas femininas de tilápia do Nilo, a seta branca aponta para uma rede densa de fibras de colágeno.

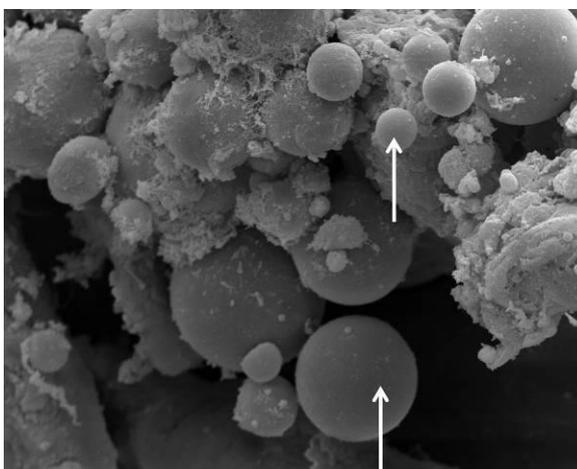


Figura 11. Eletronmicrografias de gônadas femininas de tilápia do Nilo, as setas brancas apontam para ovócito em diferentes estádios de maturação.

Discussão

Os resultados de qualidade de água observados durante o período de 75 dias de cultivo estão dentro do considerado como ideal por Popma e Lovshin (1996) e Tachibana et al. (2004), para o desenvolvimento de peixes de água doce.

Neste experimento, os resultados macroscópicos das gônadas demonstraram haver diferenças anatômicas entre testículos e ovários. Resultados semelhantes aos apresentados neste trabalho também foram observados por Meijide et al. (2005) que mostraram que os testículos em estádios iniciais de desenvolvimento de *Cichlasoma dimerus* eram menores que os ovários de mesmo estágio. Wassermann e Afonso (2002) também relataram diferenças entre as gônadas de machos e fêmeas de alevinos de tilápia do Nilo, sendo que as gônadas femininas eram mais grossas, opacas, arredondadas e com a parte anterior disposta mais caudalmente do que o testículo. Os autores ainda afirmaram que a avaliação macroscópica das gônadas permitiu identificar o sexo dos indivíduos, uma vez que 100% dos resultados obtidos por meio da análise macroscópica coincidiram com a análise histológica de tais gônadas. Contudo, segundo Razak et al. (1999), a caracterização visual das gônadas da tilápia é um método pouco preciso, tornando necessária a utilização de métodos como o histológico, para a confirmação do sexo do animal. Em particular no caso do presente trabalho, o tamanho dos alevinos não permitia uma análise macroscópica confiável.

O método citológico mostrou-se confiável na avaliação do sexo da gônada estudada e demonstrou que os indivíduos diagnosticados como machos aos 75 dias de vida apresentavam estruturas semelhantes a túbulos seminíferos e aqueles identificados como fêmeas exibiram ovócitos em diferentes estádios de desenvolvimento. Makino et al. (2009) afirmaram que o método de sexagem com coloração a fresco das gônadas com acetato carmim é eficiente quando realizado em peixes com idades maiores que 60 dias, uma vez que, segundo Carvalho e Foresti (1996), a diferenciação morfológica das gônadas masculinas da tilápia do Nilo ocorre somente após 68 dias de vida, enquanto que nas fêmeas a diferenciação sexual acontece precocemente aos 48 dias de vida. Segundo Babiker e Ibrahim (1979), o desenvolvimento das gônadas na tilápia do Nilo está intimamente associado ao crescimento corporal.

A microscopia eletrônica de varredura é utilizada, normalmente, para a observação de superfícies. Contudo, nesse experimento, a fragmentação das gônadas, logo após a fixação do material, permitiu a visualização de estruturas internas de

gônadas masculinas e femininas. Uma análise comparativa entre os resultados obtidos pela técnica de microscopia eletrônica de varredura e da técnica histológica permitiu a confirmação da identificação de tais estruturas.

Resultados de microscopia de luz semelhantes aos desse experimento foram obtidos por García-López et al. (2005), em cortes transversais de gônadas masculinas de *Solea senegalensis*. Tais autores relataram a presença de duas regiões principais, denominadas de região cortical e medular. A região cortical é formada pela túnica albugínea (cápsula fina de tecido conjuntivo), e por lóbulos seminíferos, formados por células germinativas associadas a células somáticas de Sertoli. A região medular é caracterizada por apresentar espermatocistos em desenvolvimento, normalmente em pequena quantidade. Vilela (2003) descreveu o testículo da tilápia do Nilo como um órgão externamente revestido pela túnica albugínea, estando os ductos espermáticos localizados dorsalmente. A região compreendida entre essas duas estruturas é denominada pelo autor como parênquima testicular, o qual é formado pelos túbulos seminíferos e pelo compartimento intertubular, onde se encontram as células de Leydig. O compartimento tubular é caracterizado por apresentar células de Sertoli e as células germinativas que irão formar os espermatozoides (KOULISH et al., 2002; LO NOSTRO et al., 2003). No interstício são encontrados vasos sanguíneos, fibras nervosas, células e fibras do tecido conjuntivo, além das células de Leydig. Nos peixes, as células de Sertoli também apresentam capacidade esteroidogênica. No entanto, semelhantemente aos mamíferos as células de Leydig são a principal fonte de esteroides, que são hormônios importantes para a diferenciação sexual, desenvolvimento das características sexuais secundárias, comportamento sexual e para a regulação da espermatogênese (SCHULZ, 2003).

Nos resultados da microscopia eletrônica de varredura foi possível observar a presença de fibras de colágeno. Marques et al. (2000) afirmaram que o estroma de testículos de *Hoplias malabaricus* é constituído por tecido conjuntivo de aspecto fibroso frouxo, onde se localizam agrupamentos de células da linhagem germinativa.

As células germinativas denominadas espermatogônias foram observadas nos testículos de tilápia do Nilo, nos três diferentes métodos utilizados nesse experimento. As espermatogônias são as maiores células da linhagem germinativa e encontram-se solitárias ou em cistos. Seu citoplasma apresenta pouca afinidade pelo corante e apresentam um núcleo esférico grande e evidente, com cromatina condensada em grumos localizados periféricamente e com um único nucléolo grande e central

(PUDNEY, 1995; MIURA, 1999; MARQUES et al., 2000; KOULISH et al., 2002; SCHULZ; MIURA, 2002; LO NOSTRO et al., 2003). No interior dos espermatocistos, as espermatogônias primárias se associam às células somáticas (células de Sertoli) que as envolvem com processos citoplasmáticos. Portanto cada espermatocisto possui no seu interior células germinativas em uma mesma fase de desenvolvimento (ANDRADE et al., 2001). As células de Sertoli são descritas como tendo o núcleo com forma variável, podendo ser triangular, fusiforme, ovalado, achatado ou sem formas definidas, e que têm geralmente cromatina condensada na periferia da membrana nuclear, nucléolo proeminente e único, posição excêntrica ou central, e em raras ocasiões podem ser observados dois nucléolos proeminentes (SELMAN; WALLACE, 1986; FLORES; BURNS, 1993; ROMAGOSA et al., 1999).

Nos teleósteos, o processo espermatogênico é classificado quanto à distribuição das espermatogônias ao longo dos túbulos seminíferos, o primeiro tipo é denominado espermatogonial restrito, onde as espermatogônias estão restritas à posição distal do túbulo seminífero e o tipo espermatogonial irrestrito, onde as espermatogônias estão aleatoriamente distribuídas ao longo do túbulo seminífero. Segundo Vilela (2003), aparentemente a tilápia do Nilo apresenta um arranjo peculiar quanto à distribuição dos cistos de espermatogônias, as quais ocupam posição intermediária entre os tipos restrito e irrestrito, sendo que nessa espécie os cistos de espermatogônia, embora se encontrem mais concentrados na extremidade distal do túbulo seminífero, também são observados ao longo do restante do túbulo.

As fotomicrografias dos cortes histológicos das gônadas femininas apresentavam ovócitos em diferentes estádios de maturação. Esses resultados são semelhantes aos descritos por Neves et al. (2009) em ovários de tilápia do Nilo, que relataram a presença de uma cápsula de tecido conjuntivo que envolve grande número de oócitos de diâmetro pequeno e imaturos, rodeado por fibras de colágeno e vasos sanguíneos raros. Os mesmos autores ainda descreveram a presença de dois tipos de oócitos morfológicamente distintos, um tipo em menor quantidade, com ovócitos menores e arredondados que apresentavam núcleo central com dois ou três nucléolos basófilos e citoplasma raro e basófilo. O segundo tipo é encontrado em maior número no ovário, com diâmetro maior, forma poligonal, nucléolos múltiplos localizados na região central ou periférica do núcleo, o citoplasma basófilo mais abundante e é rodeado por células foliculares pavimentosas.

Morfológicamente, o ovário dos teleósteos, de acordo com Ravaglia e Maggese (2002), é envolvido por uma serosa peritoneal, constituída pelo mesotélio e por uma lâmina de tecido conjuntivo fibroso e que contém principalmente fibras musculares lisas e tecido conjuntivo denso. As fibras musculares são orientadas em diferentes maneiras e parecem estar dispostas em pelo menos três camadas distintas. A túnica albugínea de natureza conjuntiva está logo abaixo, sendo que essa emite septos para o interior dos ovários, formando as lamelas ovulíferas, nas quais se encontram ovogônias e ovócitos em diferentes fases de desenvolvimento.

O método citológico de coloração a fresco com acetato carmim foi utilizado com sucesso em vários trabalhos (GUERRERO; SHELTON, 1974; CARVALHO; FORESTI, 1996; PALLER; GUERREIRO III, 2001; WASSERMANN; AFONSO, 2002; BOMBARDELLI et al., 2004; TACHIBANA et al., 2004; MAKINO et al., 2009; NEUMANN, 2009). Wassermann e Afonso (2002) recomendaram tal método como uma alternativa na redução de custos, sendo menos dispendioso e de mais simples execução que a análise das gônadas na rotina histológica. O método histológico também foi, nesse experimento, uma ferramenta precisa para a determinação sexual de alevinos de tilápia, quando utilizada em peixes com tamanho suficiente para ser manipulado. Nakaghi et al. (2009) utilizaram cortes histológicos para avaliar o sexo gonadal de alevinos de tilápia com 35 dias de vida e relataram que 88,7% dos indivíduos apresentavam gônadas indiferenciadas. O mesmo foi descrito por Makino et al. (2009), ao observar que a sexagem histológica em tilápias do Nilo aos 35 dias de idade mostravam gônadas imaturas e com grande quantidade de tecido de natureza conjuntivo-fibrosa. Os mesmos autores ainda relataram que peixes com idade próxima de 35 dias são ainda muito pequenos, o que torna difícil a retirada e o processamento histológico das gônadas. Além disso, segundo Makino (2009), o processo de sexagem que utiliza a histologia das gônadas necessita de reagentes, corantes e equipamento para análise, o que torna a técnica difícil e onerosa impossibilitando a sua aplicação para o piscicultor.

Conclusão

Nesse experimento, tanto as técnicas citológicas, como as estruturais e ultraestruturais foram eficientes para reconhecer o sexo das gônadas de tilápia do Nilo,

sendo que as estruturas presentes em cada uma das gônadas foram facilmente observadas.

Referências

ANDRADE, R. F.; BAZOLLI, N.; RIZZO, E.; SATO, Y. Continuous gametogenesis in the neotropical freshwater teleost, *Bryconops affinis* (Pisces: Characidae). **Tissue and Cell**, v. 33, n. 5, p. 524-532, 2001.

BABIKER, M. M.; IBRAHIM, H. Studies on the biology of reproduction in the cichlid *Tilapia nilotica* (L.): gonadal maturation and fecundity. **Journal of Fish Biology**, v. 14, n. 1, p. 437-448, 1979.

BLAZQUEZ, M.; BOSMA, P. T.; FRASER, E. J.; VAN LOOK, K. J. W.; TRUDEAU, V. L. Fish as models for the neuroendocrine regulation of reproduction and growth. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 119, n. 3, p. 345-364, 1998.

BOMBARDELLI, R. A.; HAYASHI, C.; MEURER, F.; FORNARI, D. C. Avaliação de rações fareladas e micropelletizadas para larvas de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) – desempenho e efetividade da reversão sexual. **Acta Scientiarum**, v. 26, n. 2, p. 197-201, 2004.

CARVALHO, E. D.; FORESTI, F. Reversão de sexo em tilápia-do-Nilo, *Oreochromis niloticus*, TREWAVAS, 1983, induzida por 17-alfa-metiltestosterona: proporção de sexo e histologia de gônadas. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 56, n. 2, p. 249-262, 1996.

CHAN, S. T. H.; YEUNG, W. S. B. Sex Control and Sex Reversal in Fish Under Natural Conditions. **Fish Physiology**, v. 9, part 2, p. 171-222, 1983.

DAN, N. C.; LITTLE, D. C. The culture performance of monosex and mixed-sex new-season and overwintered fry in three strains of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in northern Vietnam. **Aquaculture**, v. 184, n. 3-4, p. 221-231, 2000.

DEVLIN, R. H.; NAGAHAMA, Y. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. **Aquaculture**, v. 208, n. 3, p. 191-364, 2002.

FLORES, J. A.; BURNS, J. R. Ultrastructural study of embryonic and early adult germ cells, and their support cells, in both sexes of Xiphophorus (Teleostei: Poeciliidae). **Cell and Tissue Research**, v. 271, n. 2, p. 263-270, 1993.

GALE W. L.; FITZPATRICK, M. S.; LUCERO M.; CONTRERAS-SÁNCHEZ, W. M.; SCHRECK, C. B. Maculinization of Nile tilapia by immersion in androgens. **Aquaculture**, v. 178, n. 4, p. 349-357, 1999.

GÁRCIA-LÓPEZ, Á.; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, G.; SARASQUETE, C. Male reproductive system in Senegalese sole *Solea senegalensis* (Kaup): Anatomy, histology and histochemistry. **Histology and Histopathology**, v. 20, n. 4, p. 1179-1189, 2005.

GOLTERMAN, H. L.; CLYMO, R. S.; OHNSTAD, M. A. M. **Methods for physical and chemical analysis of fresh water**. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1978.

GUERRERO, R. D.; SHELTON, W. L. An acetate-carmin squash technique for sexing juvenile fishes. **Progressive Fish Culturist**, v. 36, n. 1, p. 56, 1974.

KOULISH, S.; KRAMER, C. R.; GRIER, H. J. Organization of the male gonad in a protogynous fish, *Thalassoma bifasciatum* (Teleostei: Labridae). **Journal of Morphology**, v. 254, n. 3, p. 292-311, 2002.

LO NOSTRO, F. L.; GRIER, H.; MEIJIDE, F. J.; GUERRERO, G. A. Ultrastructure of the testis in *Synbranchus marmoratus* (Teleostei, Synbranchidae): the germinal compartment. **Tissue and Cell**, v. 35, n. 2, p. 121-132, 2003.

MAKINO, L. C.; OKADA, L. S.; PAES, M. C. F.; MALHEIROS, E. B.; DIAS-KOBERSTEIN, T. C. R. Efetividade de métodos de identificação sexual em tilápias-do-nilo (*Oreochromis niloticus*) revertidas sexualmente com hormônio em ração com diferentes granulometrias. **Bioscience Journal**, v. 25, n. 2, p. 112-121, 2009.

MARQUES, D. K. S.; ROSA, L. L.; GURGEL, H. C. B. Descrição histológica de gônadas de traíra *Hoplias malabaricus* (Bloch) (Osteichthyes, Erythrinidae) da barragem do rio Gramame, Alhandra, Paraíba, Brasil. **Revista brasileira de Zoologia**, v. 17, n. 3, p. 573-582, 2000.

MEIJIDE, F. J.; LO NOSTRO, F. L.; GUERRERO, G. A. Gonadal Development and Sex Differentiation in the Cichlid Fish *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes): A Light- and Electron-Microscopic Study. **Journal of Morphology**, v. 264, n. 2, p. 191-210, 2005.

MIURA, T. Espermatogenic cycle in fish. In: KNOBIL, E.; NEIL, J. D. (Eds.). **Encyclopedia of reproduction**. London: Academic Press, 1999. v. 4, p. 571-578.

NAKAGHI, L. S. O.; PAES, M. C. F.; MAKINO, L. C.; DIAS-KOBERSTEIN, T. C. R.; MALHEIROS, E. B. Sexagem histológica e desempenho de *Oreochromis niloticus* testando diâmetros de ração de acordo com o aparato bucal. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 3, p. 721-727, 2009.

NAKAMURA, M.; KOBAYASHI, T.; CHANG, X. T.; NAGAHAMA, Y. Gonadal sex differentiation in teleost fish. **Journal Experimental Zoology**, v. 281, n. 5, p. 362-372, 1998.

NEUMANN, E.; DIAS KOBERSTEIN, T. C. R.; DE SOUZA BRAGA, F. M. Desempenho de três linhagens de tilápia submetidas ao tratamento com 17 α -metiltestosterona em condições ambientais não controladas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n. 6, p. 973-979, 2009.

NEVES, P. R.; NATALI, M. R. M.; RIBEIRO, R. P.; VARGAS, L.; MAEHANA, K. R.; MARENGONI, N. G. Morphological characteristics of ovarian development of two Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) strains in mixed-culture systems. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 5, p. 1173-1182, 2009.

PALLER, V. G. V.; GUERRERO III, R. D. Histological effects of 17 α -methyltestosterone on gonadal sex differentiation of *Oreochromis niloticus* L. fry. **Asia Life Sciences**, v. 10, n. 1, p. 55-68, 2001.

POPMA, T. J.; LOVSHIN, L. **Worldwide prospects for commercial production of tilapia**. Auburn: Auburn University, 1996. (Research and development, 41).

PUDNEY, J. Spermatogenesis in nonmammalian vertebrates. **Microscopy Research and Technique**, v. 32, n. 6, p. 459-497, 1995.

RAVAGLIA, M. A.; MAGGESE, M. C. Oogenesis in the swamp eel *Synbranchus armoratus* (Bloch, 1795) (Teleostei; synbranchidae). Ovarian anatomy, stages of oocyte development and micropyle structure. **Biocell**, v. 26, n. 3, p. 325-337, 2002.

RAZAK, S. A.; HWANG, G. L.; RAHMAN, M. A.; MACLEAN, N. Growth Performance and Gonadal Development of Growth Enhanced Transgenic Tilapia *Oreochromis niloticus* (L.) Following Heat-Shock-Induced Triploidy. **Marine Biotechnology**, v. 1, n. 6, p. 533-544, 1999.

ROMAGOSA, E.; NARAHARA, M. Y.; BORELLA, M. I.; PARIERA, S. F.; FENERICH-VERANI, N. Ultrastructure of the germ cells in the testis of matrinxã, *Brycon cephalus* (Teleostei, Characidae). **Tissue and Cell**, v. 31, n. 6, p. 540-544, 1999.

SELMAN, K.; WALLACE, R. A. Gametogenesis in *Fundulus heteroclitus*. **American Zoologist**, v. 26, n. 1, p. 173-192, 1986.

SCHULZ, R. W. Endocrine regulation of spermatogenesis in teleost fish. **ARBS Annual Review of Biomedical Sciences**, v. 5, n. 1, p. 57-58, 2003.

SCHULZ, R. W.; MIURA, T. Spermatogenesis and its endocrine regulation. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 26, n. 1, p. 43-56, 2002.

STRÜSSMANN, C. A.; NAKAMURA, M. Morphology, endocrinology, and environmental modulation of gonadal sex differentiation in teleost fishes. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 26, n. 1, p. 13-29, 2002.

TACHIBANA, L.; CASTAGNOLLI, N.; PEZZATO, L. E.; BARROS, M. M.; VALE, J. B.; SIQUEIRA, M. R. Desempenho de diferentes linhagens de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) na fase de reversão sexual. **Acta Scientiarum**, v. 26, n. 3, p. 305-311, 2004.

VILELA, D. A. R.; SILVA, S. G. B.; PEIXOTO, M. T. D.; GODINHO, H. P.; FRANÇA L. R. Spermatogenesis in teleost: insights from the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) model. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 28, n. 1-4, p. 187-190, 2003.

WASSERMANN, G. J.; AFONSO, L. O. B. Validação da técnica do acetato-carmim para avaliar o sexo de alevinos de tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*). **Ciência Rural**, v. 32, n. 1, p. 133-139, 2002.

YAMAMOTO, T. Artificially induced sex reversal in genotypic males of the medaka (*Oryzias latipes*). **Journal of Experimental Zoology**, v. 123, n. 3, p. 571-594, 1953.